

**MANUFAKTUR POLY (LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) (PLGA)
NANOPARTIKEL PEMBAWA RIFAMPIN DENGAN METODE
NANOPRESIPITASI DENGAN ATAU TANPA POLY (VINYL-ALCOHOL)
(PVA) SEBAGAI STABILIZER**

Mardiyanto¹⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Sriwijaya
Surel: dianto72@yahoo.com

ABSTRACT

The research on the development of technology production that is incorporated poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (NPs) with rifampin has been conducted. Nanoprecipitation method was used with or without the addition of poly(vinyl-alcohol) (PVA) as a stabilizer. Against the produced particles will be used to develop the treatment of tuberculosis (TB) as an infectious diseases. TB, a disease is known as a difficult to overcome because the pathogenic bacteria that cause TB can survive in the human lung macrophages. Rifampin will be damaged after the entry the macrophages. Thatway, by creating Particles, rifampin will effectively attack the bacterial pathogens within macrophages. The resulted particles were submicron particles are sized of 202 nm with PVA and 212 nm without PVA, and zeta potentialnya is -12 with PVA and without PVA is -14 mV. The particle surface is smooth and spherical shape were visualized by scanning electron microscopy (SEM).

Keywords: nanoparticles, nanoprecipitation method, poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), poly vinyl-alcohol (PVA).

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang pengembangan teknologi produksi *poly(lactic-co-glycolic acid)* (PLGA) nanopartikel (NPs) yang diinkorporasikan rifampin. Metode nanopresipitasi digunakan dengan atau tanpa penambahan *poly(vinyl-alcohol)* PVA sebagai *stabilizer*. Terhadap partikel yang dihasilkan akan digunakan untuk mengembangkan dunia pengobatan penyakit infeksi TBC. Penyakit TBC dikenal dengan penyakit yang sulit untuk ditanggulangi karena bakteri patogen penyebab TBC dapat bertahan di makrofag paru-paru manusia. Rifampin akan rusak setelah masuk dalam makrofag. Sehingga dengan NPs, rifampin akan efektif menyerang bakteri patogen di dalam makrofag. Partikel submikron yang dihasilkan adalah berukuran 202 nm dengan PVA dan berukuran 212 nm tanpa PVA dan zeta potentialnya adalah -12 dan -14 mV. Permukaan partikel adalah smooth dan berbentuk sferik yang divisualisasikan dengan *scanning electron microscopy* (SEM).

Kata kunci: metode nanopresipitasi, nanopartikel, *poly lactic-co-glycolic acid* (PLGA), *poly vinyl-alcohol* (PVA).

PENDAHULUAN

Sel-sel imun adalah untuk mempertahankan tubuh dari serangan benda asing termasuk bakteri patogen. Namun, jika bakteri patogen hidup dalam sel imun manusia maka itu adalah kondisi yang sulit untuk diantisipasi. Seperti halnya *Mycobacterium tuberculosis*, tidak salah jika penyakit seperti TBC juga sulit untuk diatasi (Karyadi, 2000 ; Moghazet, 1996).

Sampai saat ini sudah banyak penelitian mengenai pengembangan pengobatan untuk melumpuhkan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Selama bakteri patogen seperti ini mampu bersembunyi dan bertahan di makrofag, obat seperti apa yang mampu melumpuhkannya (Moghazet, 1996 ; Walters, 1996).

Kemampuan bersembunyi dan bertahan ini jugalah yang membuat dosis pemberian antibiotik rifampin jadi besar karena tidak semua molekul obat itu bisa berkontak dengan si bakteri patogen ini kemudian menjadi resisten (Walters, 1996), dan molekul sisa akan meracuni sel bagian tubuh yang sehat (Barichello, 1999). Tahun 2013, HIPs *Saarland University* di Jerman sudah mengembangkan metode kultivasi makrofag paru-paru manusia dan di Institut ini dikembangkan preparasi dari nanopartikel (NPs) yang *biodegradable* dan *biocompatible*. Telah dilaporkan juga bahwa partikel berukuran *sub-micron* dapat diuptake secara optimal oleh sel makrofag (Jain, 2000 ; Ravi, 2004 ; Astete, 2006 ; Balla, 2004).

Berdasarkan informasi di atas, maka perlu ditemukan teknologi untuk mengembangkan bahan baku obat. Pada penelitian ini, nanoteknologi digunakan (Cohen-sela, 2009 ; Kawashima, 2008 ; Niwa, 1994) untuk memodifikasi rifampin menjadi NPs yang diharapkan mampu menjangkau *Mycobacterium* yang bersembunyi dalam makrofag sehingga kasus ketidak efektifan obat dan resistensi bisa diatasi ke



depannya. Penemuan teknologi yang spesifik ini adalah berorientasi pada kebutuhan/persoalan nyata dan perlu dijadikan budaya riset seperti yang dikehendaki dalam mendukung kesehatan dan kesejahteraan bangsa Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium teknologi farmasi, Prodi Farmasi FMIPA UNSRI. Alat zeta-sizer digunakan untuk pengukuran *particles size analysis* (PSA) yang dilakukan di UII Yogyakarta. Peralatan utama lainnya yang dibutuhkan untuk pengukuran AFM dan SEM dikerjakan di *Institute of Biopharmaceutical and Technology Pharmacy, Saarland University, Germany* serta pengukuran TEM dilakukan di Jurusan Kimia UGM. Rentang waktu penelitian adalah dari bulan Mei hingga Oktober 2015.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : *poly(lactic-co-glicolic acid)* (PLGA) dari *Evonik Laboratories, Germany*. *Poly(vinyl-alcohol)* (PVA) dari *Kuraray, Japan*. Rifampin dari *Sigma Aldrich, Germany* dan pelarut berkualitas yang tinggi seperti : etil asetat, aseton, asetonitril, dan etanol diperoleh dari *Merc, Darmstad, Germany*.

Pelaksanaan penelitian dimulai dari pembuatan larutan PLGA dan larutan *stabilizer*. Sistem *solvent* yang dilakukan adalah pencampuran sama banyak asetonitril dan etanol dan non *solvent* nya ada dua jenis yaitu yang mengandung PVA atau yang tidak mengandung PVA. Selanjutnya dilakukan nanopresipitasi dalam sebuah *chamber* yang dilengkapi dengan *stirer*. Setelah suspensi tercipta, maka proses penguapan *solvent* dilakukan dalam suhu ruangan *overnight* (Mardiyanto,2015)).

Pembuatan larutan PLGA dan PVA sebagai tahap awal penelitian adalah dengan mencoba variasi pelarut dimulai dari aseton, asetonitril, dan etanol, serta campuran dari mereka. PVA dibuat dengan melarutkannya dalam akuades dan dipnaskan pada suhu 60 °C *overnight*. Larutan PVA kemudian disaring dengan penyaring *vacum*. Hasil saringan dimasukkan dalam tabung steril dan biarkan beberapa saat, setelah itu baru disimpan di dalam lemari pendingin.

Komposisi *solvent* yang baik, digunakan dalam proses nanopresipitasi. Dengan memasukkan larutan PLGA ke dalam *syring*, proses injeksi dapat dilakukan ke dalam larutan PVA yang distirer pada suhu ruangan. Proses injeksi dilakukan secara bertahap hingga terlihat suspensi terbentuk (Barichello,1999 ; Mardiyanto,2015).

Proses evaporasi dilakukan setelah suspensi terbentuk. Proses ini dilakukan pada suhu ruangan *overnight* (lebih kurang selama 12 jam). *Solvent* yang menguap berindikasi pada suspensi yang terlihat agak pekat. Penhilangan *solvent* dapat juga dilakukan secara organoleptik dengan tanda berupa aroma dari *solvent* tersebut.

Suspensi selanjutnya dimurnikan. Pemurnian dilakukan dengan proses sentrifugasi 3000 RPM selama 5 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang dan endapan diresuspensikan dengan PBS pH 7.4 bersama *vortex*.

Pengukuran dengan *zeta-sizer*, *atomic forced microscopy* (AFM), *scanning electron microscopy* (SEM), dan *transmission electron microscopy* (TEM) dilakukan setelah proses pemurnian. Empat jenis pengukuran tidak menggunakan suspensi partikel yang terlalu pekat. Kepekatan dapat dicegah dengan cara mengencerkan sampel dari 10 hingga 100 x. PDI yang diketahui dari alat dari *zeta-sizer* akan dibandingkan dengan PDI dari AFM dan SEM. PDI dari AFM dan SEM diketahui dari metode grafik (Mardiyanto, 2015).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi NPs untuk tujuan pengobatan sangat disarankan agar melibatkan *polymer* yang dapat didegradasi dan dapat juga diterima oleh tubuh manusia tanpa efek samping, dan ini dikenal dengan istilah yang populer yaitu *biodegradable* dan *biocompatible polymer*. FDA telah merekomendasikan *poly(lactic-co-glicolic acid)* (PLGA) sebagai *polymer* untuk dapat digunakan dalam memproduksi NPs. Sejak direkomendasikan oleh FDA produk PLGA mulai dilirik oleh industri farmasi. Hingga saat ini belum ada produk farmasi PLGA NPs yang beredar di perdagangan untuk mengatasi penyakit infeksi. Produk yang ditargetkan untuk obat kanker beberapanya sudah dipatenkan.

Pembuatan NPs tergantung kepada jenis bahan obat yang akan digunakan. Bahan obat yang hidrofob akan lebih mudah untuk dipreparasi dan loadingnya terbukti tinggi dengan menggunakan teknik *single emulsion*. Kebalikanya untuk bahan obat yang hidrofilik, teknik ini tidak cocok, dan tentunya nanopresipitasi dan *double emulsion* lebih dipilih.

Pengkreasian PLGA dengan senyawa yang bisa berfluoresen untuk imaging dari suatu aktivitas yang diinginkan, telah menjadikan NPs memiliki daya ungkit dalam menjawab kemajuan zaman. Bagaiman partikel yang kecil dapat menemui reseptornya dalam sel dapat divisualisasikan.

Sejauh ini rifampin telah digunakan untuk menanggulangi penyakit TBC dan rifampin dijadikan dalam bentuk kapsul dan tablet. Diketahui dosis pemberian rifampin adalah besar, dan banyak laporan efek samping dari penggunaanya hingga kasus resistensi.

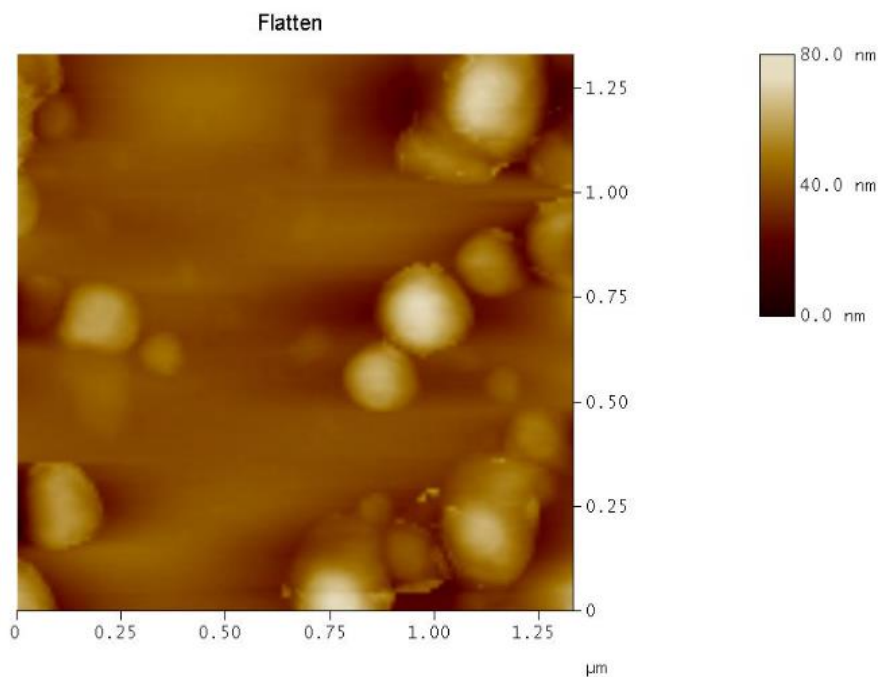
Hasil pengukuran *zeta-sizer* dapat dilihat pada Tabel 1 yang mengindikasikan bahwa stabilizer dapat memperkecil ukuran partikel.

Tabel 1. Particles Size Analysis Dari PLGA-Rifampin NPS

Formula	Physical Properties		
	Diameter (nm)	PDI	Zeta-potential
Dengan PVA	(202±12) nm	(0.10±0.02)	(-12±1.01) mV
Tanpa PVA	(220±23) nm	(0.20±0.1)	(-14±1.03) mV

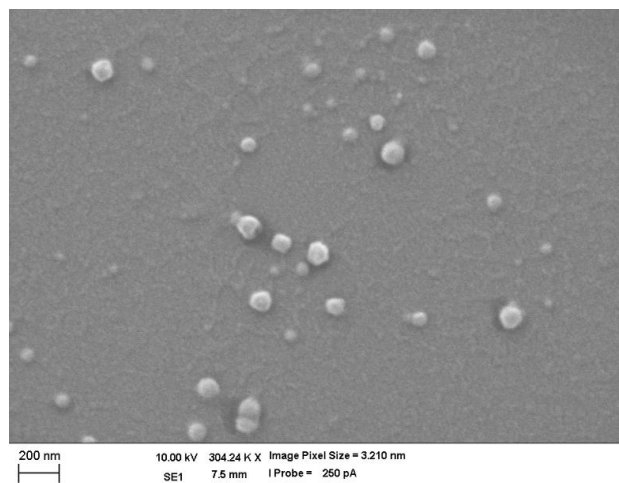
Hasil dari Tabel 1 mengindikasikan PDI yang tidak lebih dari 0.3 artinya partikel terdistribusi dalam ukuran yang seragam. Hasilnya juga dapat dibandingkan dengan *image* dari mikroskop berupa AFM, SEM, dan TEM dengan partikel yang seragam sehingga perbandingan PDI memberikan informasi yang berharga.

Image dari AFM, SEM, dan TEM dari formula yang baik yaitu yang menggunakan PVA sebagai stabilizer dapat dilihat pada gambar 1 hingga gambar 3 di bawah ini.



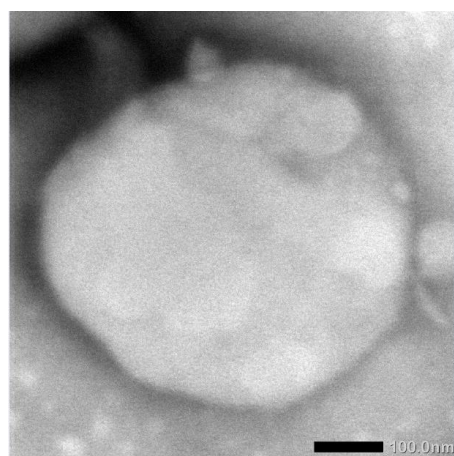
Gambar 1. AFM *image* dari PLGA-rifampin yang dinanopresipitasi dengan PVA

Terlihat dari AFM *image*, bahwa partikel berada dalam rentang submikron dengan permukaan yang rata serta berbentuk spheris. Partikel dapat diresuspensi dengan baik. Ukuran rata-rata adalah seragam sehingga mengindikasikan PDI yang tidak lebih dari 0.3. Data dari zeta-sizer adalah 0.1 sehingga dalam kesempatan perbandingan PDI secara simultan dapat dilakukan. banyak kasus, agak sulit menemukan kecocokan PDI apa lagi sampel berupa biomaterial.



Gambar 2. SEM *image* dari PLGA-rifampin yang dinanopresipitasi dengan PVA

Ukuran partikel yang tidak lebih dari submikron (500 nm) juga dapat dilihat di image yang dihasilkan dari pengukuran TEM seperti pada gambar 3 di bawah ini



Gambar 3. TEM *image* dari PLGA-rifampin yang dinanopresipitasi dengan PVA



KESIMPULAN DAN SARAN

Metode nanopresipitasi sukses digunakan untuk menghasilkan submikron partikel pembawa rifampin.

Partikel submikron yang dihasilkan adalah berukuran 202 nm dengan PVA dan berukuran 212 nm tanpa PVA dan zeta potensialnya adalah -12 dan -14 mV. Permukaan partikel adalah smooth dan berbentuk sferik yang divisualisasikan dengan SEM.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh kementerian riset dan teknologi Indonesia dengan program Insentif Riset SINAS untuk tahun pelaksanaan 2015 dengan kode Riset Terapan (RT)-non Konsersium.

DAFTAR PUSTAKA

- Astete CE, & Sabliov CM. 2006. Synthesis and characterization of PLGA Nanoparticles. *J Biomater Sci Polym Ed.* 17(3): 247-289.
- Bala I, Hariharan S, & Kumar MN. 2004. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit Rev Drug Carrier Syst.* 21(5):387-393.
- Barichello JM, Takayama K, & Nagai T. 1999. Encapsulation of and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm* 25(4):471-476.
- Cohen-Sela E, Chorny M, Koroukhov N, Danenberg HD, & Golomb G. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J Controlled Release.* (2)-90-95.
- Jain RA. 200?. The manufacturing techniques of various drug loaded Biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomater*", 21(23):2475-2490.
- Karyadi E & Schultink W. 2000. Poor micronutrient status of active tuberculosis patients in Indonesia. *Nutrition* 130(12): 2953-2958.



- Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, Hino T, & Niwa T. 1998. Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. *Eur J Biopharm.* 45(1): 41-48.
- Moghazeh S, & Pan XI. 1996. Comparative antimycobacterial activities of rifampin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known rpoB mutations. *Antimicrobial Agents.* 40(11): 2655-2657.
- Mardiyanto, 2015. Preparatioan and Characterization of PLGA Submicron Particles Incorporating Rifampin Using Emulsion Solvent Disussion Methods. *Proceed. ICB Pharma.* 2(1):10-16.
- Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, & Kawashima Y. 1994. In vitro drug release behavior of D,L-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres with nafarelin acetate prepared by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method. *J Pharm Sci.* 83(5). pp 727-32.
- Walters SB & Hana BA. 1996. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by mycobacterium growth indicator tube method. *Clin Microb.* 34(6): 1565-1567.
- Ravi Kumar MN, Bakowsky U, & Lehr CM. 2004. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomater.* 25(10): 1771-1777.