

**OPTIMASI DAN KARAKTERISASI MIKROSKOPIK
NANOPARTIKEL *POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID)*
RIFAMPISIN BERLABEL FLUORESCEINAMINE DENGAN
VARIASI *POLY(VINYL ALCOHOL)* DAN WAKTU SONIKASI**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi
(S.Farm.) di bidang studi Farmasi pada Fakultas MIPA**



Oleh :

INDRA WIJAYA

08121006030

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SRIWIJAYA**

2017

HALAMAN PENGESAHAN MAKALAH SEMINAR HASIL

Judul Makalah : OPTIMASI DAN KARAKTERISASI MIKROSKOPIK
NANOPARTIKEL *POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC
ACID)* RIFAMPISIN BERLABEL
FLUORESCHEINAMINE DENGAN VARIASI
POLY(VINYL ALCOHOL) DAN WAKTU SONIKASI

Nama Mahasiswa : INDRA WIJAYA
NIM : 08121006030
Program Studi : FARMASI

Telah dipertahankan di hadapan Pembimbing dan Pembahas pada Seminar Hasil di Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya pada tanggal 10 Juli 2017 dan telah diperbaiki, diperiksa, serta disetujui sesuai dengan saran yang diberikan.

Inderalaya, 19 Juli 2017

Pembimbing :

1. Dr.rer.nat. Mardiyanto, M.Si., Apt.
NIP. 197103101998021002

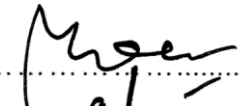
(.....


2. Najma Annuria Fithri, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP. 198803252015042002

(.....


Pembahas :

1. Dr. Hj. Budi Untari, M.Si., Apt.
NIP. 195810261987032002

(.....


2. Herlina, M.Kes., Apt.
NIP. 197107031998022001

(.....


3. Yoshua Maranatha S., S.Farm., M.Si., Apt.
NIPUS. 1999009152016011201

(.....


Mengetahui,
Ketua Program Studi Farmasi
Fakultas MIPA, UNSRI

Dr.rer.nat. Mardiyanto, M.Si., Apt.
NIP. 197103101998021002

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

Judul Skripsi : OPTIMASI DAN KARAKTERISASI MIKROSKOPIK
NANOPARTIKEL *POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC
ACID)* RIFAMPISIN BERLABEL
FLUORESC EINAMINE DENGAN VARIASI
POLY(VINYL ALCOHOL) DAN WAKTU SONIKASI

Nama Mahasiswa : INDRA WIJAYA
NIM : 08121006030
Program Studi : FARMASI

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Sidang Ujian Skripsi Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya pada tanggal 27 Juli 2017 dan telah diperbaiki, diperiksa, serta disetujui sesuai dengan saran yang diberikan.

Inderalaya, 29 Juli 2017

Ketua :

1. Dr.rer.nat. Mardiyanto, M.Si., Apt.
NIP. 197103101998021002


(.....)

Anggota:

1. Najma Annuria Fithri, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP. 198803252015042002
2. Dr. Hj. Budi Untari, M.Si., Apt.
NIP. 195810261987032002
3. Indah Solihah, M.Sc., Apt.
NIPUS. 198803082014082201
4. Rennie Puspa Novita, M. Farm. Klin., Apt.
NIPUS. 198711272013012201


(.....)


(.....)


(.....)


(.....)

Mengetahui,
Ketua Program Studi Farmasi
Fakultas MIPA, UNSRI

Dr.rer.nat. Mardiyanto, M.Si., Apt.
NIP. 197103101998021002

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Indra Wijaya

NIM : 08121006030

Fakultas/Program Studi : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam/Farmasi

Menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan karya ilmiah ini belum pernah diajukan sebagai pemenuhan persyaratan untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata satu (S1) dari Universitas Sriwijaya maupun perguruan tinggi lain. Semua informasi yang dimuat dalam skripsi ini yang berasal dari penulis lain baik yang dipublikasikan atau tidak telah diberikan penghargaan dengan mengutip nama sumber penulis secara benar. Semua isi dari skripsi ini sepenuhnya menjadi tanggung jawab saya sebagai penulis.

Demikianlah surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Inderalaya, Juli 2017

Penulis,



Indra Wijaya

NIM. 08121006030

**HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK
KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai civitas akademik Universitas Sriwijaya, yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Indra Wijaya
NIM : 08121006030
Fakultas/Program Studi : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam/Farmasi
Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Sriwijaya “hak bebas royalti non-eksklusif” (*non-exclusive royalty-free right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul: “Optimasi dan Karakterisasi Mikroskopik Nanopartikel *Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)* Rifampisin Berlabel Fluoresceinamine dengan Variasi *Poly(Vinyl Alcohol)* dan Waktu Sonikasi” beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan hak bebas royalti non-eksklusif ini Universitas Sriwijaya berhak menyimpan, mengalihmedia/memformatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir atau skripsi saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya.

Inderalaya, Juli 2017
Penulis,

Indra Wijaya
NIM. 08121006030

HALAMAN PERSEMBAHAN DAN MOTTO

Subhanallah, Walhamdulillah, Walailaha illallah, Wallahu Akbar

Segala Puji Bagi Allah, Tuhan Semesta Alam

Kupersembahkan skripsi ini kepada:

Kedua Orang Tuaku tercinta,

Kelurgaku,

Teman-temanku,

Para Pencari Ilmu yang Haus Akan Ilmu Pengetahuan

Motto:

“Lakukan yang terbaik dan berdoa, setelahnya pasrahkan kepada Allah, biarkan jalan Allah yang menunjukkan yang terbaik buat kita. Proses tidak akan pernah mengkhianati hasil”

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas karunia dan rahmat-Nya sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul “Optimasi dan Karakterisasi Mikroskopik Nanopartikel *Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)* Rifampisin Berlabel Fluoresceinamine dengan Variasi *Poly(Vinyl Alcohol)* dan Waktu Sonikasi” ini dengan baik. Penyusunan skripsi ini bertujuan sebagai salah satu syarat untuk dapat meraih gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) di program studi farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Sriwijaya.

Skripsi ini memuat informasi mengenai penggunaan *ultrasonicator probe* sebagai salah satu alat *homogenizer* pada teknologi partikel yang berguna untuk meningkatkan karakter dari partikel zat aktif, khususnya dalam hal ini adalah partikel rifampisin. Penulis berharap penelitian ini tidak hanya sebatas ini saja, tetapi dapat dilanjutkan dan dikembangkan kembali sehingga mampu memperbaiki kekurangan dari skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak akan selesai bila tidak mendapatkan bantuan dari pihak-pihak terkait. Izinkan saya sebagai penulis pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati untuk mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu dan Alm. Ayah tercinta serta kedua adikku yang telah memberikan dukungan dan motivasinya selama ini yang tidak bisa penulis ungkapkan dengan kata-kata sehingga berkat mereka penulis mampu menyelesaikan kuliah di farmasi UNSRI.
2. Rektor Universitas Sriwijaya, Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, serta Ketua Program Studi Farmasi yang telah menyediakan sarana dan prasana selama perkuliahan dan penelitian hingga selesai.
3. Bapak Dr.rer.nat. Mardiyanto, M.Si., Apt. selaku pembimbing pertama yang telah memberikan ide, arahan, bimbingan, serta motivasi untuk selalu semangat dalam menyelesaikan penelitian ini.
4. Ibu Najma Annuria Fithri, M.Sc., Apt. selaku pembimbing kedua yang selalu memberi arahan untuk kesempurnaan skripsi ini dan motivasi yang terus penulis ingat bahwa “pasti bisa”.

5. Ibu Riri Akrimah, M.Si., Apt. dan Ibu Laida Neti Mulyani, M.Si. sebagai pembimbing akademik penulis yang telah memberikan arahan, masukan, dan sekaligus motivasi untuk terus selalu maju dan menjadi lebih baik.
6. Ibu Dr. Budi Untari, M.Si., Apt., Ibu Herlina, M.Kes., Apt., dan Bapak Yosua Maranatha Sihotang, M.Si., Apt., Ibu Annisa Amriani, S. M. Farm., Apt., dan Ibu Laida Neti Mulyani, M.Si. selaku dosen penguji atas kritik dan saran yang telah diberikan untuk kesempurnaan skripsi ini.
7. Seluruh dosen Program Studi Farmasi FMIPA UNSRI dan dosen FMIPA lainnya yang mengajar di farmasi atas ilmu dan bantuan yang telah diberikan selama ini.
8. Seluruh staf di farmasi UNSRI (Eka Ria, A.Md dan Supriadi) dan seluruh analis di farmasi UNSRI atas bantuannya selama ini.
9. Bapak Yandi Syukri, M.Si., Apt. dan Bapak Bambang Hernawan Nugroho, M.Sc., Apt., selaku Kepala Laboratorium Nanofabrication di farmasi UII yang telah memberikan kesempatan dan bantuan untuk melakukan penelitian disana.
10. Teman-teman dan adik-adik dari farmasi UII (Fahmi, Suci, dan Cita) serta analis di Farmasi UII (Mas Hartanto dan Mas Angga) atas waktu dan bantuannya selama ini.
11. Tim penelitian sepekerjaan skripsi pengaruh mekanik teknologi partikel (Muhammad Fithri, Ahmad Faiz Taimiyah, Thio Hasbullah, Ercik Agung Wibowo) untuk kerjasama dan bantuannya selama ini. Tetap kompak selalu dan Sukses.
12. Firda Tri Monisia yang telah cerewet dalam memberi semangat agar penulis tetap kuat dalam revisinya dan cepat lulus serta meneruskan kuliah apoteker
13. Teman-teman sesepuh nanoteknologi (Try Saputra, Andrew, Jeffry Yosua, Randi Hermawan, Randi Nopyasin, dan Indah Dwi Mandala) yang telah membimbing penulis saat proses awal penelitian berlangsung hingga selesai.
14. Teman-teman farmasi angkatan 2012 (M.Rizky, Nuryadin, Pabel, Adik, Ola, Laila, Hanum, Fera, Idan, Chai, PW, Dwi, Ario, Imam) atas bantuan, kenangan, dan canda tawa selama kuliah di sini. Semoga kita semua akan menjadi orang sukses dan dapat berjumpa kembali di lain kesempatan.

15. Kakak dan adik-adik tingkat di farmasi UNSRI (2011 {Rinda, Gita Z, Soimah, Rsika, dll}, 2013 {Vephy, Masayu, Ekanov, Rosmiati, Widya, Rulli, Adel Endang, Putnov, Wines, Septi, Nia, Disa, Al, Erin, Winda} atas bantuan dan semangatnya. Sukses selalu.
16. Semua pihak terkait yang telah memberikan bantuan yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu.

Akhir kata, penulis menerima semua kritik dan saran dari semua pihak demi kemajuan dan untuk perbaikan agar skripsi ini menjadi lebih baik lagi. Harapan penulis semoga skripsi bisa menambah khasanah pengetahuan bagi pembaca dan dapat berguna dalam memajukan ilmu pengobatan di bidang farmasi.

Inderalaya, Juli 2017
Penulis,

Indra Wijaya
NIM. 08121006030

**Optimization and Microscopic Characterization of Nanoparticles
Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Rifampicin Labeled Fluoresceinamine with
Variation Poly(Vinyl Alcohol) and Sonication Time**

**Indra Wijaya
08121006030**

ABSTRACT

According to Biopharmaceutics Classification System (BCS), rifampicin is classified in class II which means it has low solubility in water but high permeability towards biological membrane. Low solubility will affect drug's bioavailability hence, preparation and characterization of nano rifampicin was done to improve the solubility in order to improve the bioavailability and reduce the risk of side effects from rifampicin in large doses. The resulting nanoparticles can increase penetration into the macrophages so that a faster macrophage uptake occurs. Preparation of rifampicin into nanoparticle, using poly(lactic-co-glycolic acid) as encapsulation polymer and poly(vinyl alcohol) as stabilizer with emulsion solvent evaporation method in single emulsion type process. These nanoparticles were consisted of rifampicin, fluoresceinamine, PLGA, PVA, and ethyl acetate with variation of PVA 40 mg and 50 mg and 30 seconds and 60 seconds of sonication time. The determination of percentage of encapsulation efficiency (% EE) obtained result for optimum formula is $90.58 \pm 0.15\%$ with PVA 50 mg and time of sonication 60 seconds. The optimum formula was determined by using 2^2 factorial design method in estimating the dominant effect to decide its respon using Design Expert[®] version 10. The result of nanoparticles characterization such as diameter and particles distribution (Poly Dispersity Index/PDI) and potential zeta using Particle Size Analyzer (PSA) were 384 nm; 0.032; and +2.6 mV. Morphology particle of optimum formula was observed using Transmission Electron Microscope (TEM) showed spheric particles and homogen which PDI of 0.111. Uptake observation of macrophages using confocal laser scanning microscopy. PLGA-rifampicin-labeled fluoresceinamine nanoparticles produce a green color on microscopic observations while macrophages are red when fluorescence occurs. In the uptake of macrophages, the observed nanoparticles are yellow in color indicating a macrophage uptake occurs in nanoparticles whereas the nanoparticles attached to the macrophage surface are green when fluorescence occurs.

Keywords: Rifampicin, Nanoparticles, Ultrasonicator, Macrophage Uptake, Factorial Design

Optimasi dan Karakterisasi Mikroskopik Nanopartikel *Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)* Rifampisin Berlabel Fluoresceinamine dengan Variasi *Poly(Vinyl Alcohol)* dan Waktu Sonikasi

**Indra Wijaya
08121006030**

ABSTRAK

Rifampisin tergolong dalam *Biopharmaceutics Classification System* (BCS) kelas II yang menunjukkan bahwa kelarutannya rendah dalam air tetapi memiliki permeabilitas yang tinggi. Kelarutan yang rendah akan memengaruhi bioavailabilitas suatu obat maka dilakukan preparasi dan karakterisasi terhadap rifampisin menjadi ukuran nano untuk meningkatkan kelarutannya sehingga dapat memperbaiki bioavailabilitasnya dan menurunkan risiko efek samping dari rifampisin yang penggunaannya dalam dosis besar. Nanopartikel yang dihasilkan dapat meningkatkan penetrasi ke dalam makrofag sehingga proses uptake makrofag lebih cepat terjadi. Preparasi rifampisin menjadi nanopartikel dengan polimer penjerap *poly(lactic-co-glycolic acid)* dan *stabilizer poly(vinyl alcohol)* dengan *emulsion solvent evaporation* dalam tipe *single emulsion process*. Komponen nanopartikel terdiri dari rifampisin, fluoresceinamine, PLGA, PVA, dan etil asetat menggunakan variasi PVA 40 mg dan 50 mg serta waktu sonikasi 30 detik dan 60 detik. Penentuan persen efisiensi enkapsulasi (% EE) diperoleh hasil untuk formula optimum yaitu antara lain $90,58 \pm 0,15$ % dengan PVA 50 mg dan waktu sonikasi 60 detik. Formula optimum didapatkan dengan metode desain faktorial 2^2 yang dapat memperkirakan efek yang dominan dalam menentukan respon menggunakan Design-Expert[®] versi 10. Hasil karakterisasi nanopartikel seperti diameter dan distribusi partikel (*Poly Dispersity Index*/PDI), serta zeta potensial menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA) pada formula optimum adalah 384 nm; 0,032; dan +2,6 mV. Morfologi partikel formula optimum diamati dengan menggunakan alat *transmission electron microscope* (TEM) menunjukkan partikel berbentuk *spheric* dan terpisah dengan baik yang memiliki nilai PDI sebesar 0,111. Pengamatan uptake makrofag menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM). Nanopartikel PLGA-rifampisin berlabel fluoresceinamine menghasilkan warna hijau pada pengamatan mikroskop sedangkan makrofag berwarna merah saat berfluoresensi. Pada uptake makrofag, nanopartikel yang teramati berwarna kuning yang menandakan telah terjadi proses uptake makrofag pada nanopartikel sedangkan nanopartikel yang menempel pada permukaan makrofag berwarna hijau saat terjadi fluoresensi.

Kata kunci: Rifampisin, Nanopartikel, Sonikasi, Uptake Makrofag, Desain Faktorial

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN MAKALAH SEMINAR HASIL	ii
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	v
HALAMAN PERSEMBAHAN DAN MOTTO	vi
KATA PENGANTAR	vii
ABSTRACT.....	x
ABSTRAK.....	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Tuberkulosis	7
2.2 Sel Makrofag	8
2.3 Rifampisin	10
2.3.1 Rumus Struktur	11
2.3.2 Sifat Fisikokimia.....	11
2.3.3 Farmakokinetik dan Farmakodinamik	12
2.3.3.1 Mekanisme Kerja.....	13
2.3.3.2 Sediaan, Penggunaan, dan Dosis	13
2.3.3.3 Indikasi, Kontraindikasi, dan Efek Samping	14
2.3.4 Interaksi Obat.....	14
2.4 Fluoresceinamine.....	15
2.4.1 Rumus Struktur	15
2.4.2 Sifat Fisikokimia.....	16
2.5 <i>Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)</i>	17
2.6 Teknologi Partikel	19
2.7 Metode Pembuatan Nanopartikel	20
2.7.1 Bahan Pembuat Nanopartikel.....	22
2.7.1.1 <i>Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)</i> (PLGA).....	23
2.7.1.2 <i>Poly(Vinyl Alcohol)</i> (PVA)	24
2.7.2 Karakterisasi Nanopartikel	26
2.7.2.1 Morfologi Partikel	26

2.7.2.2	Diameter, Distribusi Ukuran Partikel, dan Zeta Potensial	28
2.8	Persen Efisiensi Enkapsulasi	29
2.9	Optimasi dengan Desain Faktorial	30
BAB III	METODOLOGI PENELITIAN	34
3.1	Waktu dan Tempat	34
3.2	Alat dan Bahan	34
3.2.1	Alat	34
3.2.2	Bahan.....	34
3.3	Preparasi Bahan.....	35
3.3.1	Preparasi Rifampisin	35
3.3.2	Preparasi PLGA.....	35
3.3.3	Preparasi PVA	35
3.4	Formulasi.....	36
3.5	Pembuatan Nanopartikel Fluoresceinamine dalam PLGA-Rifampisin	37
3.6	Purifikasi Partikel dan Penentuan Persen Efisiensi Enkapsulasi (EE) Fluoresceinamine dalam PLGA-Rifampisin.....	37
3.7	Evaluasi dan Karakterisasi Partikel.....	38
3.7.1	Penentuan Nilai <i>Polydispersity Index</i> (PDI) dan Nilai Zeta Potensial Partikel.....	38
3.7.2	Pengamatan Morfologi Partikel	39
3.8	Analisis Data	39
3.8.1	Penafsiran Hasil Pengamatan <i>Transmission Electron Microscopy</i> (TEM) dan <i>Particle Size Analyzer</i> (PSA)	39
3.9	Preparasi Kultur Sel Makrofag	40
3.10	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (CLSM)	41
3.11	Desain Faktorial.....	41
3.11.1	Optimasi Formula dengan Desain Faktorial	41
3.11.2	Penafsiran Hasil Optimasi	42
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
4.1.	Preparasi Bahan	43
4.2	Pembuatan Nanopartikel PLGA-Rifampisin.....	47
4.3	Purifikasi Nanopartikel PLGA-Rifampisin	50
4.4	Evaluasi dan Karakterisasi Nanopartikel PLGA-Rifampisin	51
4.4.1	Penentuan Persen Efisiensi Enkapsulasi (%EE)	51
4.4.2	Diameter dan Ukuran Partikel.....	56
4.4.3	Penentuan Nilai <i>Polydispersity Index</i> (PDI)	60
4.4.4	Optimasi Formula Optimum Nanopartikel PLGA-Rifampisin	63
4.4.5	Zeta Potensial Nanopartikel PLGA-Rifampisin.....	66
4.4.6	Penentuan Morfologi Nanopartikel PLGA-Rifampisin	67
4.4.7	Pengamatan <i>Uptake</i> Makrofag dengan CLSM	70
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN.....	74
5.1	Kesimpulan.....	74
5.2	Saran.....	74

DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN.....	84
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	108

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Rancangan percobaan desain faktorial dua faktor dan dua level.....	32
Tabel 2. Susunan faktor level berdasarkan desain faktorial.....	36
Tabel 3. Level kombinasi konsentrasi PVA dan waktu sonikator berdasarkan desain faktorial.....	36
Tabel 4. Formulasi nanopartikel PLGA-rifampisin	36
Tabel 5. Karakteristik persen EE nanopartikel PLGA-rifampisin	54
Tabel 6. Pengaruh faktor dan interaksi terhadap persen EE	54
Tabel 7. Karakteristik ukuran nanopartikel PLGA-rifampisin	58
Tabel 8. Pengaruh faktor dan interaksi terhadap ukuran	58
Tabel 9. Karakteristik PDI nanopartikel PLGA-rifampisin.....	61
Tabel 10. Pengaruh faktor dan interaksi terhadap PDI.....	61
Tabel 11. Kriteria masing-masing respon pada <i>overlay plot</i>	64
Tabel 12. Perbandingan hasil prediksi dan observasi	65

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur rifampisin	11
Gambar 2. Struktur fluoresceinamine	15
Gambar 3. <i>Confocal laser scanning microscope</i>	19
Gambar 4. Struktur PLGA	24
Gambar 5. Struktur PVA.....	25
Gambar 6. Larutan PLGA.....	45
Gambar 7. Reaksi degradasi PLGA	45
Gambar 8. Ikatan rifampisin-PLGA-fluoresceinamine.....	46
Gambar 9. Mekanisme kavitasi pada sonikator	49
Gambar 10. Interaksi PVA dan waktu sonikasi serta <i>contour plot</i> persen EE.....	55
Gambar 11. Gerak Brown nanopartikel PLGA-rifampisin.....	57
Gambar 12. Interaksi PVA dan waktu sonikasi serta <i>contour plot</i> ukuran.....	59
Gambar 13. Interaksi PVA dan waktu sonikasi serta <i>contour plot</i> PDI	62
Gambar 14. <i>Overlay plot spray</i> nanopartikel PLGA-rifampisin variasi konsentrasi PVA dan waktu sonikasi dan <i>desirability</i>	63
Gambar 15. Pori membran sel.....	68
Gambar 16. Hasil uji morfologi partikel PLGA-rifampisin formula optimum menggunakan TEM dan ImageJ®	69
Gambar 17. Grafik distribusi ukuran partikel TEM.....	70
Gambar 18. Hasil CLSM pada nanopartikel PLGA-rifampisin berlabel fluoresceinamine, makrofag kosong, dan <i>uptake</i> makrofag	73

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Skema Kerja Umum	84
Lampiran 2. <i>Certificate of Analysis</i> Rifampisin.....	85
Lampiran 3. Nanopartikel PLGA-Rifampisin.....	86
Lampiran 4. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Rifampisin	87
Lampiran 5. Kurva Kalibrasi Persen EE Rifampisin	88
Lampiran 6. Persen EE PLGA-Rifampisin	89
Lampiran 7. Sertifikat Ukuran dan PDI Formula 1 PLGA-Rifampisin.....	90
Lampiran 8. Sertifikat Ukuran dan PDI Formula 2 PLGA-Rifampisin.....	91
Lampiran 9. Sertifikat Ukuran dan PDI Formula 3 PLGA-Rifampisin.....	92
Lampiran 10. Sertifikat Ukuran dan PDI Formula 4 PLGA-Rifampisin.....	93
Lampiran 11. Sertifikat Zeta Potensial Formula 4 PLGA-Rifampisin	94
Lampiran 12. Hasil Olah Gambar TEM dengan ImageJ®	95
Lampiran 13. Hasil TEM	96
Lampiran 14. Pengamatan <i>Uptake</i> Makrofag dengan CLSM.....	97
Lampiran 15. Hasil Olah Data SPSS®	98
Lampiran 16. Analisis Data Aktual dan Prediksi dengan <i>One-Sample Test</i>	102
Lampiran 17. Contoh Perhitungan Manual Efek Masing-Masing Faktor	103
Lampiran 17. Jenis Grafik Design Expert®10.....	106

DAFTAR SINGKATAN

%EE	: Persen Efisiensi Enkapsulasi
%CV	: Persen <i>Coefficient of Variance</i>
ADI	: <i>Acceptable Daily Intake</i>
AFDA	: <i>American Food Drug Administration</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
API	: <i>Aqua Pro Injection</i>
BCS	: <i>Biopharmaceutics Classification System</i>
BM	: Berat Molekul
BTA	: Bakteri Tahan Asam
CLSM	: <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CYP	: Sitokrom-P
Df	: <i>Degree of Freedom</i>
DLS	: <i>Dynamic Light Scattering</i>
DMF	: Dimetilformamida
DMSO	: Dimetil Sulfoksida
DNA	: <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
HOCL	: Hipoklorit
kgBB	: Kilogram Berat Badan
kDa	: KiloDalton
kHz	: KiloHertz
kV	: KiloVolt
LD	: <i>Lethal Dose</i>
logP	: Logaritma Koefisien Partisi
logS	: Logaritma Koefisien Kelarutan
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MPO	: <i>Myeloperoksidase</i>
MTB	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mV	: MiliVolt
NADP	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
OAT	: Obat Anti Tuberkulosis
O/W	: <i>Oil In Water</i>
p.a.	: Pro Analisis
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDI	: <i>Poly Dispersity Index</i>
PGA	: <i>Poly(Glycolic Acid)</i>
pKa	: Konstanta Disosiasi Asam
PLA	: <i>Poly(Lactic Acid)</i>
PLGA	: <i>Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)</i>
PMT	: <i>Photo Multiplier Tuber</i>
PSA	: <i>Particle Size Analyzer</i>
PVA	: <i>Poly(Vinyl Alcohol)</i>
QEA	: <i>Quality External Assurance</i>

R ²	: Koefisien Determinasi
R	: <i>Correlation Coefficient</i>
RNA	: <i>Ribose Nucleic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
Rpm	: Rotasi Per Menit
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSD	: <i>Relative Standard Deviation</i>
Sig	: Signifikasi
sps	: Sewaktu-Pagi-Sewaktu
SPSS®	: <i>Statistical Product and Service Solutions</i>
SEM	: <i>Scanning Electron Microscope</i>
STEM	: <i>Scanning Transmission Electron Microscope</i>
TB	: Tuberkulosis
TEM	: <i>Transmission Electron Microscope</i>
UV-Vis	: <i>Ultraviolet-Visible</i>
W/O/W	: <i>Water In Oil In Water</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) yang termasuk penyakit menular kronik dan masih menjadi masalah kesehatan utama di dunia dan di Indonesia. Pada tahun 2013, terdapat sekitar 8,7 milyar penderita TB kasus baru dan angka kematian akibat TB di seluruh dunia mencapai 990.000 jiwa sehingga diperlukan upaya yang serius untuk mengatasinya. Standar terapi tuberkulosis secara umum menggunakan obat anti tuberkulosis (OAT) seperti isoniazid, rifampisin, etambutol, pirazinamida, dan streptomisin. Obat antituberkulosis paling banyak diberikan adalah kombinasi isoniazid-rifampisin-pirazinamid, kombinasi isoniazid-rifampisin, dan kombinasi isoniazid-rifampisin-etambutol dengan lama pengobatan lengkap selama 6 bulan agar infeksi yang ditimbulkan MTB tidak resisten (WHO, 2013).

Waktu penggunaan obat yang lama menjadi masalah yang cukup signifikan sehingga perlu dilakukan pembuatan teknologi nanopartikel yang berpotensi dalam menurunkan penggunaan OAT yang lama sehingga penggunaan pemakaian OAT dapat dipersingkat dan efek rifampisin menjadi lebih efektif. Rifampisin merupakan obat lini pertama untuk terapi tuberkulosis. Obat ini termasuk makrosiklik antibiotik kompleks yang menghambat sintesis asam ribonukleat dalam berbagai mikroba patogen. Efek rifampisin bersifat bakterisida dan efek sterilisasi efektif melawan *Mycobacterium tuberculosis* baik intraseluler dan ekstraseluler (Kasim, 2011).

Masalah signifikan yang dihasilkan dari efek samping rifampisin yang digunakan secara terus-menerus yaitu dapat menimbulkan gangguan saluran cerna dan menghasilkan hepatotoksisitas (Reddy *et al.*, 2010). Sifat kelarutan yang dimiliki rifampisin bersifat rendah dengan permeabilitas yang baik, sehingga tergolong dalam BCS (*Biopharmaceutics Classification System*) kelas II (Adebayo *and* Farlane, 2014). Sifat kelarutan yang buruk dalam air mengakibatkan disolusinya terbatas serta kecepatan absorpsinya rendah, sehingga dapat menyebabkan penundaan kerja obat (Gandhi *et al.*, 2014). Masalah permeabilitas dan risiko efek samping dari suatu obat yang penggunaannya dalam dosis besar dapat diatasi dengan memanfaatkan teknologi partikel. Ukuran partikel obat akan diubah menjadi ukuran yang lebih kecil, sehingga akan menurunkan dosis terapi dari obat yang dapat menurunkan efek samping dari penggunaan dan meningkatkan permeabilitas dari partikel obat. Manfaat lain yang dapat diperoleh dari teknologi partikel adalah peningkatan efektivitas penggunaan suatu obat dan menghindari risiko degradasi obat dalam tubuh (Guirguis, 2013).

Penggunaan teknologi partikel dapat menangani permasalahan bakteri MTB yang masih dapat bertahan di paru-paru setelah diberi sediaan rifampisin oral. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang telah masuk ke dalam makrofag dapat menghasilkan enzim yang dapat menetralkan radikal bebas di dalam makrofag sehingga bakteri MTB tidak mati dan bersembunyi di dalam makrofag dan menyebabkan sediaan obat oral rifampisin tidak akan efektif dalam penggunaannya. Teknologi partikel polimer berperan dalam menghindarkan rifampisin dari kondisi oksidatif dalam makrofag paru-paru sehingga bakteri MTB dapat dicerna secara maksimal dan dapat membantu kinerja rifampisin menjadi

lebih efektif dalam penyembuhan penyakit TB dengan efek samping yang kecil (Kumar *et al.*, 2005) Sistem pembawa menggunakan polimer dengan teknologi partikel dapat meningkatkan efektivitas terapi, mengurangi efek samping, mengurangi dosis serta frekuensi dosis obat menjadi terkontrol (Badescu *et al.*, 2008). Sediaan nanopartikel PLGA-rifampisin yang berlabel fluoresceinamine yang telah masuk ke dalam makrofag akan *biodegradable* yang menyebabkan nanopartikel pecah di dalam makrofag. PVA sebagai *stabilizer* akan terlepas pada kondisi oksidatif di dalam makrofag dan enzim yang dihasilkan dari bakteri MTB dapat menyebabkan PLGA sebagai polimer akan terlepas sehingga rifampisin dapat efektif dalam membunuh bakteri MTB.

Penggunaan teknologi partikel yang digunakan berupa sediaan suspensi yang dapat meningkatkan efektivitas terapi. Suspensi nanopartikel rifampisin terdapat 2 komponen penyusun yang penting yaitu polimer dan *stabilizer*. Pada penelitian ini menggunakan kombinasi polimer PLGA (*Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)*) dan PVA (*Poly(Vinyl Alcohol)*) sebagai *stabilizer*. Kombinasi antara PLGA dan PVA dipilih karena memiliki ikatan yang kuat dan stabil antara gugus hidroksil pada PVA dengan gugus asetil pada permukaan PLGA. Penggunaan PVA sebagai *stabilizer*, akan menghasilkan suatu partikel berpori dan memiliki kemampuan menyerap cairan di sekitar partikel, sehingga PVA sesuai digunakan sebagai *stabilizer* (Virlan *et al.*, 2015).

Metode sonikasi digunakan pada proses homogenisasi ukuran partikel dengan kekuatan 40 kV yang dapat menghasilkan gelombang ultrasonik sebesar 20 – 100 kHz sehingga partikel-partikel rifampisin menjadi ukuran yang lebih kecil (Castro *et al.*, 2006). Waktu sonikasi 30 dan 60 detik dipilih karena termasuk dalam

rentang waktu sonikasi yang optimal untuk konsentrasi PVA 50 mg yaitu 30 – 90 detik. Berdasarkan penelitian Hafsy (2015) menyimpulkan bahwa penambahan konsentrasi PVA sebagai *stabilizer* berpengaruh terhadap persen efisiensi enkapsulasi partikel PLGA-rifampisin yang digunakan sebagai acuan variasi konsentrasi PVA dalam penelitian ini. Semakin tinggi konsentrasi penambahan PVA tidak menghasilkan %EE yang lebih baik dan menunjukkan bahwa konsentrasi PVA yang paling optimal dalam menghasilkan %EE yang tinggi yakni PVA 50 mg. Variasi konsentrasi PVA, metode sonikasi, PLGA dan rifampisin yang digunakan harus sesuai dengan metode pembuatan teknologi partikel yang akan dilakukan. Metode pembuatan nanopartikel PLGA-rifampisin menggunakan metode *emulsion-solvent evaporation* karena antara polimer dan rifampisin yang digunakan memiliki kesamaan sifat kelarutannya (Abdelwahed *et al.*, 2006).

Nanopartikel PLGA-rifampisin yang dihasilkan akan dikarakterisasi dengan pengamatan morfologi, diameter, distribusi partikel, keseragaman ukuran, nilai zeta potensial, nilai persen efisiensi enkapsulasi (%EE), dan permeabilitas. Pengamatan morfologi diperlukan untuk mengetahui bagaimana permukaan partikel yang dihasilkan. Karakterisasi diameter dan keseragaman ukuran dilakukan agar dapat mengetahui nilai *Poly Dispersity Index* (PDI) dari partikel yang dihasilkan. Kestabilan dari partikel yang dihasilkan dapat diketahui dengan penentuan nilai zeta potensial. Keberhasilan dari proses enkapsulasi partikel dapat diketahui dengan perhitungan nilai persen EE. Pembuatan nanopartikel PLGA-rifampisin digunakan pelabelan warna yaitu fluoresceinamine yang mudah didapatkan dan menghasilkan fluoresensi yang lebih terang dalam menghasilkan pendaran warna agar proses *uptake* makrofag dapat terlihat jelas. Pelabelan warna fluoresceinamine digunakan

karena sudah banyak digunakan untuk pelabelan warna fluoresensi yang dapat Pengamatan nanopartikel PLGA-rifampisin diamati pada proses *uptake* menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) agar dapat menghasilkan gambar yang berlabel fluorescence. Warna atau pendar yang dihasilkan pada pengamatan CLSM menunjukkan jumlah nanopartikel yang terdapat di dalam dan juga di luar makrofag.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh waktu sonikasi dan konsentrasi PVA terhadap persen efisiensi enkapsulasi, PDI, dan ukuran partikel?
2. Berapa konsentrasi PVA dan waktu sonikasi yang optimum dalam pembuatan nanopartikel PLGA-rifampisin?
3. Bagaimana morfologi partikel yang dihasilkan dari formula optimum?
4. Bagaimana visualisasi proses *uptake* makrofag nanopartikel PLGA-rifampisin berlabel fluoresceinamine pada pengamatan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM)?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh waktu sonikasi dan konsentrasi PVA terhadap persen efisiensi enkapsulasi, PDI dan ukuran partikel yang diperoleh.
2. Mendapatkan konsentrasi PVA dan waktu sonikasi yang optimum dalam pembuatan nanopartikel PLGA-rifampisin.
3. Menggambarkan morfologi partikel yang dihasilkan dari formula optimum.

4. Melihat visualisasi proses *uptake* makrofag nanopartikel PLGA-rifampisin berlabel fluoresceinamine pada pengamatan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM).

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari hasil penelitian ini yaitu dapat dijadikan sebagai acuan formula optimum dengan variasi konsentrasi PVA dan waktu sonikasi pada pembuatan suspensi nanopartikel PLGA-rifampisin dalam meningkatkan permeabilitas rifampisin sehingga mempermudah *uptake* makrofag dibandingkan dengan sediaan konvensional rifampisin. Hasil nanopartikel PLGA-rifampisin berlabel fluoresceinamine pada *uptake* makrofag dapat menjadi tolak ukur untuk mengembangkan formulasi sediaan baru yang berfokus pada penghantaran obat melalui makrofag paru.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. & Fessi, H. 2006, Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage, *Eur J Pharm*, **63**: 87 – 94.
- Adebayo, S.A. & McFarlane, N. 2014, Model based bioequivalence assessment of a commercial rifampicine against pfizer zithromax tablet marketed in jamaica, *J Appl Pharma Sci*, **4**: 62 - 68.
- Agrawal, C.C., Huang, D., Schmitz, J.P. & Athanasiou, K.A. 1997, Elevated temperature degradation of a 50:50 copolymer of PLA-PGA, *J Pharm Sci*, **2**: 346 - 352.
- Allen, L.V., Popovich, N.G. & Ansel, H.C. 2011, *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*, 9th edition, Lippincott Williams & Wilkins, London, England.
- Albanese, A., Tang, S.P. & Chan, W.C.W. 2012, The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems, *J Biomed Eng*, **14**: 1 - 16.
- Badescu, V., Udrea, L.E., Rotariu, O., Badescu, R. & Apreotesei, G. 2008, On encapsulating and delivery of polyphenols in superparamagnetic polymer nanospheres, *Scientific Study & Research*, **9(2)**: 221 - 228.
- Berne, B.J. & Pecora, R. 2000, *Dynamic light scattering: With application to chemistry, biology and physic*, Dover Publications, New York, USA.
- Blonk, J.C.G., Don, A., Van, H. & Birmingham, J.J. 1993, Fluorescence photobleaching in the confocal scanning light microscope, *J Microsc*, **169**: 363 - 374.
- Bolton, S. 1997, *Pharmaceutical statistics: Practical and clinical applications*, 3rd edition, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Brelje, T.C., Wessendorf, M.W. & Sorenson, R.L. 1993, Multi color laser scanning confocal immunofluorescence microscopy for practical applications dan limitations, *Meth Cell Biol*, **38**: 98 - 177.
- Burgess, R., Beniac, D., Belova, L., Barnes, C., Crassous, P., Difiore, A., *et al.* 2010, *An introduction to electron microscopy*, FEI Company, Hillsboro, USA.
- Camner, P., Lundborg, M., Lastbom, L., Gerde, P., Gross, N. & Jarstrand, C. 2002, Experimental and calculated parameters on particle phagocytosis by alveolar macrophages, *J Appl Physiol*, **92**: 2608 - 2616.

- Castro, X.U., Rubio, M.M., Baquero, H.A. & Martinez, G.G. 2006, Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from red-grape (*Vitis vinifera*) residues, *I U Fo S T*, **2006**: 1315 - 1324.
- Cavalier, M., Benoit, J.P. & Thies, C. 1986, The formation and characterization of hydrocortisone-loaded poly((+/-)-lactide) microspheres, *J Pharm Pharmacol*, **38**: 249 - 253.
- Chithrani, D.B. 2011, Optimization of bio-nano interface using gold nanostructure as a model nanoparticle system, *In Sci J*, **1(3)**: 115 - 135.
- Darmawan, D.P. 2007, 'Pengembangan awal sistem pembawa obat polimerik berbasis nanopartikel', *Skripsi*, S.Farm., Program Studi Sains dan Teknologi Farmasi, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Bandung, Indonesia.
- Dasgupta, S., Auth, T. & Gompper, G. 2014, Shape and orientation matter for the cellular uptake of nanospherical particles, *Nano Lett*, **14**: 687 - 693.
- De, S. & Robinson, D.H. 2004, Partice size and temperature effect on the physical stability of PLGA nanospheres and microspheres containing bodipy, *AAPS Pharm Sci Tech*, **5(4)**: 18 - 24.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 1979, *Farmakope Indonesia*, edisi ke-3, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, Indonesia.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 1995, *Farmakope Indonesia*, edisi ke-4, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2007, *Penanggulangan tuberkulosis*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, Indonesia.
- Drugbank. 2014, *Rifampicin*, diakses tanggal 11 Oktober 2015, <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01045>>.
- Dunn, K. 2011, *A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy*, Department of Biological Sciences, University of Delaware, Newark, Delaware, USA.
- Gaskell, E.E., Hobbs, G., Rostron, C. & Hutcheon, G.A. 2008, Encapsulation and release of α -chymotrypsin from poly(glycosol adipate-co- ω -pentadecalactone) nanoparticles, *J micro and nano carriers*, **25**: 187 - 195.
- Gentile, P., Chino, V., Carmagnola, I. & Hatton, V.P. 2014, An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering, *Int J Mol Sci*, **15**: 3640 - 3659.
- Gordon, S.B. & Read, R.C. 2002, Macrophage defences against respiratory tract infections, *Br Med Bull*, **61**: 45 - 61.

- Gribbon, P. & Hardingham, T.E. 1998, Macromolecular diffusion of biological polymers measured by confocal fluorescence recovery after photobleaching, *Biophys J*, **75**: 1032 - 1039.
- Guilatt, L.R., Couvreur, P., Lambert, G., Goldstein, D., Benita, S. & Dubernet, C. 2004, Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions, *J Chem Phys*, **13**: 1 - 13.
- Guirguis, M. 2013, *Cancer and nanotechnology*, *Biomed Eng*, **2013**: 1, diakses pada 10 Oktober 2015, <http://www.ele.uri.edu/Courses/bme181/S13/1_MariaG_1.pdf>.
- Gunawan, S.G., Nafrialdi, R.S. & Elysabeth. 2009, *Farmakologi dan terapi*, edisi ke-2, Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia.
- Hafsy, O. 2015, 'Preparasi dan karakterisasi partikel *poly lactic co-glycolic acid* (PLGA) pembawa rifampisin dengan *poly vinyl alcohol* (PVA) sebagai *stabilizer*', *Skripsi*, S.Farm., Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya, Inderalaya, Indonesia.
- Harmita. 2004, Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya, *Int J Pharm*, **1(3)**: 117 - 135.
- Haskell, R.J. 2006, *Physical characterization of nanoparticles: Nanoparticles technology for drug delivery*, Taylor & Francis Group, New York, USA.
- Herma, P.D. 2007, 'Optimasi komposisi polietilen glikol 400 dan gliserol sebagai *humectant* dalam formula krim anti *hair loss* ekstrak saw palmetto (*Serenoa repens*): Aplikasi desain faktorial', *Skripsi*, S.Farm., Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta, Indonesia.
- Hiroyuki, T. 2010. *Application of PLGA nanospheres for skincare cosmetics*, diakses pada tanggal 16 Oktober 2016, <<http://www.Pladrugcarrier.com/application/nanospheres.html>>.
- Kasim, F. 2011, *Informasi spesialite obat (ISO) Indonesia*, PT. ISFI Penerbitan, Jakarta, Indonesia.
- Kemala, T., Budianto, E. & Soegiyono, B. 2010, Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly(lactic acid) and poly(e-caprolactone) with poly(vinyl alcohol) as emulsifier, *Arb J Chem*, **5**: 103 - 108.
- Kriswanto, P.A. & Fatimah, S.S. 2014, Pengembangan dan uji validasi metode analisis kadar parasetamol dan kafein dengan kromatografi cair kinerja tinggi, *J Sci Tec Chem*, **5**: 51 - 59.

- Kubitscheck, H., Wedekind, P. & Peters, R. 1994, Lateral diffusion measurements at high spatial resolution by scanning microphotolysis in a confocal microscope, *Biophys J*, **67**: 946 - 965.
- Kumar, C.S.S.R., Hormes, J. & Leuschner, C. 2005, Nanofabrication towards biomedical applications, *J Pharm*, **44(29)**: 4429 - 4430.
- Loong, N.C., Basri, M., Fang, L.F., Masoumi, H.RF., Tripathy, M., Karjiban, R.A., *et al.* 2014, Comparison of Box-Behnken and central composite design in optimization of fullerene loaded palm-based nanoemulsion for cosmeceutical application, *Ind Crop Prod*, **59**: 309 - 317.
- Lopes, E., Pohlmann, A.R., Bassani, V. & Guterres, S.S. 2000, Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization, *Pharmazie*, **55**: 527 - 30.
- Mardiyanto. 2013, 'Investigation of nanoparticulate formulation intended for caffeine delivery into hair follicle', *Disertasi*, Dr.rer.nat., Departement of Pharmacy, Faculty of Science, Saarland University, Saarbruecken, Germany.
- Marlinna, 2007, 'Optimasi komposisi propilen glikol dan sorbitol sebagai *humectant* dalam formula krim anti *hair loss* ekstrak saw palmetto (*Serenoa repens*): Aplikasi desain faktorial', *Skripsi*, S.Farm., Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta, Indonesia.
- Mohanraj, V.J. & Chen, Y. 2006, Nanoparticels-a review, *Trop J Pharm*, **5**: 561 - 573.
- Moin, P. 2010, *Fundamentals of engineering numerical analysis*, Cambridge University Press, New York, USA.
- Moreno, H.D., Silva, C.F.M. & Salgado, N.R.H. 2009, Stability study of rifampicin in ophthalmic preparation, *J Pharm Sci*, **45(2)**: 220 - 226.
- Muhaimin. 2013, 'Study of microparticle preparation by the solvent evaporation method using focused beam reflectance measurement (FBRM)', *Disertasi*, Dr.rer.nat., Pharmazie Study Program, Faculty of Pharmazie, Pharmazie der Freien Universitat, Berlin, Germany.
- Muppaleni, S. & Omidian, H. 2013, Polyvinyl alcohol in medicine and pharmacy: A perspective, *J Develop Drugs*, **112(2)**: 1 - 5.
- Mura, S., Hillaireau, H., Nicolas, J., Droumaguet, B.L., Gueutin, C., Zanna, S., *et al.* 2011, Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards calu-3 cells, *Int J Nano*, **6**: 2591 - 2605.

- Nataraj, K.S., Raju, S.N. & Anusha, B. 2013, UV spectrophotometric method development for estimation of rifampicin in bulk and dosage form, *Int J Pharm Bio Sci*, **3(4)**: 164 - 167.
- Newbury, D.C. 2003, *Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*, 1st edition, Plenum Press, New York, USA.
- Niemi, M., Backman, J.T., Neuvonen, M., Neuvonen, P.J. & Kivisto, K.T. 2000, Rifampicin decreases the plasma concentrations and effects of repaglinide, *Clin Pharmacol*, **68**: 495 - 500.
- Pal, L.S., Jana, U., Manna, P.K., Mohanta, G.P. & Manavalan, R. 2011, Nanoparticle: An overview of preparation and characterization, *J Pharm Sci*, **6**: 228 - 238.
- Peloquin, C.A. 2002, Therapeutic drug monitoring the treatment of tuberculosis, *J Pharm*, **62(15)**: 2169 - 2183.
- Perkumpulan Pemberantasan Tuberkulosis Indonesia. 2010, Penatalaksanaan TB MDR dan strategi dots plus, *Jurnal Tuberkulosis Indonesia*, **7**: 1 - 7.
- Pouretedal, R.H. 2014. Preparation and characterization of azithromycin nanodrug using solvent/antisolvent method, *J Int Nano Lett*, **4**: 2 - 9.
- Pubchem Chemistry Database. 2017, *Ethyl acetate*, diakses tanggal 10 Maret 2017, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ethyl_acetate>.
- Rabinovich, G.L., Couvreur, P., Lambert, G., Goldstein, D., Benita, S. & Dubernet, C. 2004, Extensive surface studies help to analyse zeta potential data for case of cationic emulsions, *Chem Phys Lipid*, **131**: 1 - 13.
- Ragazzi, M. 2013, *Fluorescence confocal microscopy for pathologists*, Pathology Unit, IRCSS Santa Maria Nuova Hospital, Reggio Emilia, Roma, Italy.
- Rajeshwari, A., Prathna, T.C., Balajee, J., Chandrasekaran, N., Mandal, A.B. & Mukherjee, A. 2013, Computational approach for particle size measurement of silver nanoparticle from electron microscopic image, *IJPPS*, **5**: 619 - 623.
- Rakhmaningtyas, A.W. 2012, 'Preparasi dan karakterisasi nanopartikel sambung silang kitosan-natrium tripolifosfat dalam sediaan film bukal verapamil hidroklorida', *Skripsi*, Program Studi Ekstensi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok, Indonesia.
- Reddy, K.R., Sabitha, P.J. & Vijaya, R. 2010, Design and evaluation of controlled release chitosan-calcium alginate microcapsules of anti tubercular drugs for oral use, *Inter J of Chem Tech Research*, **2(1)**: 88 - 98.

- Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J. & Veiga, F. 2006, Nanoencapsulation method for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2**: 8 - 21.
- Riwayati, I. 2007, Analisa resiko pengaruh partikel nano terhadap kesehatan manusia, *J Sains*, **3(2)**: 17 - 18.
- Salomon, L.L., Kosasih, W. & Angkasa, S.O. 2015, Perancangan eksperimen untuk meningkatkan kualitas ketangguhan material dan pendekatan analisis general factorial design, *J Rekayasa S Industri*, **4(1)**: 126 - 143.
- Santoso, T.A., Diniatik & Kusuma, A.M. 2013, Efek imunostimulator ekstrak etanol daun katuk (*Sauropus androgynous* L Merr) terhadap aktivitas fagositosis makrofag, *Pharmacy*, **10**: 63 - 70.
- Sari, D.K. & Lestari, R.S.D. 2015, Pengaruh waktu dan kecepatan pengadukan terhadap emulsi minyak biji matahari (*helianthus annuus* L.) dan air, *JIP*, **5(3)**: 155 - 159.
- Saxena, S.K. 2008, Polyvinyl alcohol (PVA), *Chem Tech Assessment*, **2**: 2 - 4.
- Schellenkens, R.C.A., Baltink, J.H., Woesthuis, E.M., Stellaard, F., Kosterink, J. G.W., Woerdenbag, H.J., *et al.* 2012, Film coated tablets (ColoPulse technology) for targeted delivery in the lower intestinal tract: Influence of the core composition on release characteristics, *Pharm Dev Technol*, **17(1)**: 40 - 47.
- Schmidt, A., Sucke, J., Fuschs, M., Freitag, P., Hirschburger, M., Kaufmann, A., *et al.* 2007, Macrophages in experimental rat lung isografts and allografts: infiltration and proliferation in situ, *J Leukoc Biol*, **81**: 186 -194.
- Sharma, R., Saxena, D., Dwivedi, A.K. & Misra, A. 2009, Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis, *Pharm Res*, **18**: 1405 – 1410.
- Siegel, J.S. & Makadia, K.H. 2011, Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, *J Polymers*, **3**: 1377 - 1397.
- Sigma-Aldrich. 2016, *Fluoresceinamine*, *Catalog product*, diakses tanggal 26 Juli 2016, <<http://sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w201502?lang=en®ion=ID>>.
- Silva, M.F., Hechenleitner, W., Irache, J.M., Oliveira, A.J. & Pineda, E.A. 2015, Study of thermal degradation of PLGA, PLGA nanospheres and PLGA/maghemite superparamagnetic nanospheres, *Material Research*, **18(6)**: 1400 - 1406.

- Skoog, D.A. & West, D.M. 1971, *Principles of instrumental analysis*, Holt, Rinehart and Winston Inc., New York, USA.
- Stat-Ease Inc. 2016, *Handbook for experimenters*, East Hennepin Ave, Minneapolis, USA.
- Sun, S.B., Liu, P., Shao, F.M. & Miao, Q.L. 2015. Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer, *Int J Clin Exp Med*, **8(10)**: 19670 - 19681.
- Sweetman, S.C. 2009, *Antimicrobials. in: Martindale the complete drug reference*, 36th edition, Pharmaceutical Press, London, England.
- Tjay, T.H. & Rahardja, K. 2007, *Obat-obat penting: Khasiat, penggunaan, dan efek-efek sampingnya*, edisi ke-6, PT. Elex Media Komputindo, Jakarta, Indonesia.
- Torche, A.M., Corre, P., Albina, E., Jestin, A. & Verge, R. 2000, PLGA microspheres phagocytosis by pig alveolar macrophages: influence of poly(vinyl alcohol) concentration, nature of loaded-protein and copolymer nature, *J Drug Target*, **7**: 343 - 354.
- Touhami, A. 2003, *Native cell wall organization shown by electron microscopy*, Cell Report, Washington DC, USA.
- Triyati, E. 1985, Spektrofotometer ultra-violet dan sinar tampak serta aplikasi dalam oseanologi, *Oseana LIPI*, **10(1)**: 39 - 47.
- Turk, C.T.S., Bayindir, Z.S. & Badilli, U. 2009, Preparation of polymeric nanoparticles using different stabilizing agents, *J Fac Pharm Ankara*, **38(4)**: 257 - 268.
- Ulfa, R.M. 2015, 'Optimasi *hydroxypropyl methylcellulose* dan *chitosan* pada tablet *floating-mucoadhesive gliclazide* metode desain faktorial', *Skripsi*, S.Farm., Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Jember, Indonesia.
- Usaquen, C.X., Martínez, R.H., Aya, B. & Gonzalez, M. 2006, Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from red-grape (*vitis vinifera*) residues, *IUFOST*, **38**: 1315 – 1324.
- Vandervoort, J. & Ludwig, A. 2002, Biodegradable stabilizers in the preparation of PLGA nano particles of a factorial design study, *Int J Pharm*, **238**: 77 - 92.
- Varshosaz, J., Eskandari, S. & Tabbakhian, M. 2009, Production and optimization of valproic acid nanostructured lipid carriers by the Taguchi design, *Pharm Dev Tech In press*, **78**: 321 – 345.

- Villikka, K., Kivisto, K.T. & Neuvonen, P.J. 1999, The effects of rifampicin on the pharmacokinetics of oral and intravenous ondansetron, *Clin Pharmacol*, **65**: 377 - 381.
- Virlan, M.J.R., Miricescu, D., Totan, A., Greabu, M., Tanase, C., Sabliov, C.M., *et al.* 2015, Current uses of poly(lactic-co-glycolic acid) in the dental field: A comprehensive review, *J Chem*, **201**: 1 - 12.
- Wibowo, V.H. 2013, Optimasi komposisi hidroksi propil metil selulosa dan kitosan sebagai sistem *floating-mucoadhesive* tablet teofilin, *Skripsi*, S.Farm., Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Jember, Indonesia.
- Wise, L.D. 2000, *Handbook of pharmaceutical release technology*, 1st edition, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- World Health Organization. 2013, *World health organization report 2013 global tuberculosis control*, World Health Organization, Geneva, Swiss.
- Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J. & Mao, L. 2008, Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions, *Food Res Intl*, **41**: 61 - 68.