

**DISERTASI**

**PENGARUH FORMULASI NANOKRISTAL ASAM USNAT TERHADAP  
PENURUNAN EKSPRESI MATRIKS METALOPROTEINASE-13 DAN  
PENINGKATAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE 2 PADA KELINCI  
OSTEOARTRITIS SERTA ANALISIS NANOKRISTAL  
ASAM USNAT DALAM PLASMA DARAH**

**Suatu Penelitian Eksperimental Murni Laboratorium**



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIS PROGRAM DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2022**

## ABSTRAK

### **PENGARUH FORMULASI NANOKRISTAL ASAM USNAT TERHADAP PENURUNAN EKSPRESI MATRIKS METALLOPROTEINASE-13 DAN PENINGKATAN EKSPRESI KOLAGEN TIPE 2 PADA KELINCI OSTEOARTRITIS SERTA ANALISIS NANOKRISTAL ASAM USNAT DALAM PLASMA DARAH**

**Rina Wahyuni**

Asam usnat yang diisolasi dari tumbuhan *Usnea sp* merupakan senyawa metabolit sekunder golongan dibenzofuran yang memiliki banyak aktifitas farmakologis. Namun, penggunaannya dalam bidang pengobatan terbatas, karena kelarutan yang rendah dalam air, sehingga memiliki bioavailabilitas yang rendah. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh formulasi nanokristal asam usnat terhadap karakteristik fisikokimia, laju disolusi serta aktifitas anti-inflamasinya terhadap penurunan ekspresi MMP-13 (Matriks Metaloproteinase) dan peningkatan ekspresi kolagen tipe 2 pada kelinci osteoarthritis. Selanjutnya dilakukan analisis nanokristal asam usnat dalam plasma darah.

Nanokristal dibuat dengan metode penggilingan basah menggunakan poloksamer 188 sebagai stabilisator. Penilaian ekspresi MMP-13 dan kolagen tipe 2 dilakukan dengan pewarnaan imunohistokimia. Analisis nanokristal asam usnat dalam plasma dilakukan dengan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) sistem gradient menggunakan fase gerak asetonitril dan asam asetat 0,4%. Ekstraksi nanokristal asam usnat dalam plasma dilakukan dengan metode pengendapan protein, menggunakan asetonitril sebagai pengendap protein.

Karakterisasi fisiko kimia menunjukkan karakteristik nanokristal, dengan ukuran partikel rata rata  $358,77 \pm 21,18$  nm. Laju disolusi meningkat 2,755 kali dibandingkan asam usnat isolasi. Analisis imunihistokimia terhadap ekspresi MMP-13 dan kolagen tipe 2 menunjukkan terjadinya peningkatan aktifitas nanokristal asam usnat dalam menghambat ekspresi MMP-13 dan meningkatkan ekspresi kolagen tipe 2, dibandingkan aktifitas asam usnat murni dan ibuprofen. Analisis nanokristal asam usnat dalam plasma menghasilkan perolehan kembali 65,699%; 75,046% dan 77,625% berturut turut untuk konsentrasi rendah, menengah dan tinggi.

Nanokristal asam usnat dapat memperbaiki sifat fisiko kimia asam usnat melalui pengurangan ukuran partikel. Analisis statisitik menggunakan anova satu arah menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan terhadap aktifitas nanokristal asam usnat dalam menurunkan ekspresi MMP-13 dan meningkatkan ekspresi kolagen tipe 2 dibandingkan asam usnat isolasi dan ibuprofen pada  $P < 0,05$ . Metode analisis nanokristal asam usnat dalam plasma darah dapat dikembangkan dengan sistem KCKT.

**Kata kunci:** asam usnat, nanokristal, MMP-13, Kolagen tipe 2, perolehan kembali

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF USNIC ACID NANOCRYSTAL FORMULATION ON DECREASING MATRIX METALLOPROTEINASE-13 EXPRESSION AND INCREASING TYPE 2 COLLAGEN EXPRESSION IN THE OSTEOARTHRITIS RABBIT AND ANALYSIS OF USNIC ACID NANOCRYSTAL IN BLOOD PLASMA

Rina Wahyuni

Usnic acid isolated from *Usnea sp* is a secondary metabolite compound of dibenzofuran group which has many pharmacological activities. However, its use in medicine is limited, due to its low solubility in water, so it has low bioavailability. This study aimed to examine the effect of the nanocrystal formulation of usnic acid on its physicochemical characteristics, dissolution rate and anti-inflammatory activity on the expression of MMP-13 and type 2 collagen in osteoarthritis rabbits. Furthermore, the analysis of usnic acid nanocrystals in blood plasma was carried out.

Nanocrystals were prepared by wet milling method using poloxamer 188 as a stabilizer. The expression of MMP-13 and type 2 collagen was assessed by immunohistochemical staining. Analysis of usnic acid nanocrystals in plasma was carried out using a gradient system HPLC (High Performance Liquid Chromatography) using acetonitrile and 0.4% acetic acid as mobile phases. Extraction of usnic acid nanocrystals in plasma was carried out by the protein precipitation method, using acetonitrile as the protein precipitate.

The results of physicochemical characterization showed the characteristics of nanocrystals, with an average particle size of  $358.77 \pm 21.18$  nm. The dissolution rate increased 2.755 times compared to the isolated usnic acid. Immunohistochemical analysis of the expression of MMP-13 and type 2 collagen showed an increase in the activity of usnic acid nanocrystals in inhibiting MMP-13 expression and increasing the expression of type 2 collagen, compared to the activity of pure usnic acid and ibuprofen. Analysis of usnic acid nanocrystals in plasma yielded a recovery of 65.699%; 75.046% and 77.625% for low, medium and high concentrations, respectively.

Usnic acid nanocrystals can improve the physico-chemical properties of usnic acid through particle size reduction. Statistical analysis using one-way ANOVA showed that there was a significant difference in the activity of usnic acid nanocrystals in reducing MMP-13 expression and increasing type 2 collagen expression compared to isolated usnic acid and ibuprofen at  $P < 0.05$ . The method of analyzing usnic acid nanocrystals in blood plasma can be developed using the HPLC system.

**Keyword:** usnic acid, nanocrystal, MMP-13, type 2 collagen, recovery.