

Laporan Akhir
Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2013



**OPTIMASI ALGINAT MIKROSFER SEBAGAI PEMBAWA MODEL
VAKSIN ANTIGEN DENGAN VARIASI PENYAMBUNG SILANG DARI
BEBERAPA METODE ENKAPSULASI**

1. Dewi Melani Hariyadi, SSi, MPhil, Ph.D., Apt. (Ketua), NIDN 0026027801
2. Dra. Esti Hendradi, MSi, Ph.D., Apt. (Anggota I), NIDN 0014115703
3. Dra. Tutiek Purwanti, MSi, Apt. (Anggota II), NIDN 0010025705

Dibiayai oleh BOPTN Tahun Anggaran 2013 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Nomor : 8714/UN3/KR/2013, Tanggal 25 Juni 2013

Universitas Airlangga
November 2013

Laporan Akhir
Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2013

M I B I E
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



**OPTIMASI ALGINAT MIKROSFER SEBAGAI PEMBAWA MODEL
VAKSIN ANTIGEN DENGAN VARIASI PENYAMBUNG SILANG DARI
BEBERAPA METODE ENKAPSULASI**

1. Dewi Melani Hariyadi, SSi., MPhil, Ph.D., Apt. (Ketua), NIDN: 0026027801
2. Dra. Esti Hendradi, MSi, Ph.D., Apt. (Anggota I), NIDN: 0014115703
3. Dra. Tutiek Purwanti, MSi., Apt (Anggota II), NIDN: 0010025705

Dibiayai oleh BOPTN Tahun Anggaran 2013 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor
Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Nomor : 8714/UN3/KR/2013, Tanggal 25 Juni 2013

Universitas Airlangga
November 2013

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian

: Optimasi Alginat Mikrosfer Sebagai Pembawa Model Vaksin Antigen Dengan Variasi Penyambung Silang Dari Beberapa Metode Enkapsulasi

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap

NIDN

Jabatan Fungsional

Program Studi

Nomor HP

Alamat surel (email)

Anggota (1)

Nama Lengkap

NIDN

Perguruan Tinggi

Anggota (2)

Nama Lengkap

NIDN

Perguruan Tinggi

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi mitra

Alamat

Penanggungjawab

Tahun Pelaksanaan

Biaya Tahun Berjalan

Biaya Keseluruhan

: Dewi Melani Hariyadi, SSi, MPhil, Ph.D, Apt.

: 0026027801

: Lektor

: Farmasi

: 087855989394

: dewiffua96@yahoo.com

: Dra. Esti Hendradi, MSi, Ph.D, Apt.

: 0014115703

: Universitas Airlangga

: Dra. Tutiek Purwanti, MSi, Apt.

: 0010025705

: Universitas Airlangga

: -

: -

: -

: -

: Tahun ke -1 dari rencana 2 tahun

: Rp. 50.000.000,-

: Rp. 100.000.000,-

Surabaya, 1 November 2013

Ketua Peneliti,



Dewi Melani Hariyadi, SSi, MPhil, Ph.D, Apt.

NIP 197802262002122001

Mengetahui

Dekan

Fakultas Farmasi



Dr. Umi Athiyah, MS, Apt.

NIP.195604071981032001

Mengetahui

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat



Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi.

NIP 195908051987011001

RINGKASAN

Penelitian ini merupakan serangkaian penelitian yang mempelajari tentang karakteristik fisik alginat mikrosfer sebagai pembawa ovalbumin, model vaksin antigen, dalam sistem penghantaran oral yang diproduksi menggunakan beberapa jenis sambung silang serta beberapa metode enkapsulasi. Keuntungan penelitian ini adalah memberikan kontribusi dalam bidang kefarmasian khususnya sebagai salah satu usaha mendapatkan formula mikrosfer yang optimum yang dapat mempertahankan stabilitas vaksin antigen maupun memperlambat pelepasannya sehingga memperpanjang lama kerjanya terutama dalam penggunaan vaksin secara oral.

Pada penelitian ini telah dilakukan formulasi alginat mikrosfer sebagai pembawa ovalbumin dengan variasi penyambung silang yaitu $BaCl_2$ dan $CaCl_2$ dari beberapa metode enkapsulasi untuk tujuan penggunaan oral. Formula alginat mikrosfer dibuat dengan menyambung silangkan kalsium klorida serta barium klorida dengan polimer alginat dengan menggunakan dua metode yaitu *drop method* dan aerosolisasi. Selanjutnya beberapa formula tersebut akan dikarakterisasi secara fisik dari ukuran, bentuk dan penampakan partikel alginat mikrosfer, efisiensi enkapsulasi, kandungan ovalbumin serta jumlah ovalbumin yang lepas dari alginat mikrosfer. Hasil karakteristik fisik yang didapat akan dioptimasi untuk mendapatkan formula dengan karakteristik alginat mikrosfer-ovalbumin yang optimal dan memberikan pelepasan ovalbumin yang terkontrol.

Hasil dari penelitian ini adalah mikrosfer ovalbumin-alginat dengan menggunakan beberapa konsentrasi polimer alginat dan larutan sambung silang berbeda konsentrasi yang diproduksi dengan metode aerosolisasi yang menggunakan sambung silang $BaCl_2$ dan $CaCl_2$ menghasilkan mikrosfer yang memiliki efisiensi penjebakan tinggi serta kandungan ovalbumin dan yield yang tinggi sekitar 89%. Selain itu, mikrosfer yang dihasilkan memiliki bentuk yang sferis dan hampir halus dengan ukuran partikel yang kecil dan memenuhi persyaratan ukuran partikel untuk sistem penghantaran oral yaitu 12-30 μ m. Sedangkan untuk mikrosfer yang diproduksi dengan *drop method* dapat menghasilkan mikrosfer yang sferis, namun ukurannya sangat besar (1-3 mm) serta masih terdapat masalah dalam hal pengeringan mikrosfernya, sehingga metode drop masih memerlukan optimasi lebih lanjut.

Profil pelepasan ovalbumin dari alginat mikrosfer yang menggunakan sambung silang $BaCl_2$ menunjukkan pelepasan ovalbumin lebih besar dan lebih cepat dibandingkan dengan

yang menggunakan CaCl_2 pada saat diinkubasi pada pH asam (HCl pH 1,2) selama 2 jam, demikian juga saat berada pada media PBS pH 7,4. Mikrosfer ovalbumin-alginat yang diproduksi menggunakan sambung silang CaCl_2 menunjukkan bahwa mikrosfer ini potensial untuk melindungi ovalbumin protein dari suasana asam dan dapat menghasilkan pelepasan ovalbumin yang rendah serta terkontrol pada suasana pH 7,4 yang merupakan simulasi kondisi intestinal di saluran cerna pada penggunaan per oral.

PRAKATA

Puji Syukur kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmatNYA kami dapat menyelesaikan Laporan Akhir Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun 2013 dengan judul "OPTIMASI ALGINAT MIKROSFER SEBAGAI PEMBAWA MODEL VAKSIN ANTIGEN DENGAN VARIASI PENYAMBUNG SILANG DARI BEBERAPA METODE ENKAPSULASI". Penyusunan laporan ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, untuk itu dengan rasa rendah hati saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Fasich, Apt dan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Dr. Hj. Umi Athiyah, MS, Apt yang telah memberikan kesempatan, bantuan dan fasilitas yang diberikan demi penelitian ini.
2. Ketua LPPM Universitas Airlangga Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi, atas kesempatan, bantuan dan fasilitas pendanaan yang diberikan.
3. Ketua Departemen Farmasetika Dra Hj. Esti Hendradi, MSi, Ph.D, Apt atas bimbingan dan fasilitas yang diberikan.
4. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu penyelesaian penelitian ini.

Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan hidayahNYA atas segala kebaikan dan bantuan yang diberikan.

Surabaya, November 2013

Penyusun

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
BAB 4. METODE PENELITIAN	11
BAB 5. HASIL YANG DICAPAI	17
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	30
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	35
PUBLIKASI	39



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Formula Ovalbumin-Alginat Mikrosfer	13
Tabel 5.1 Pemeriksaan kualitatif ovalbumin	17
Tabel 5.2 Pemeriksaan kualitatif natrium alginat	17
Tabel 5.3 Pemeriksaan kualitatif CaCl_2	18
Tabel 5.4 Ukuran partikel mikrosfer ovalbumin-alginat dari formula yang diproduksi dengan <i>drop method</i>	22
Tabel 5.5 Formula Ovalbumin-Alginat Mikrosfer dengan metode aerosolisasi	23
Tabel 6.1 Rencana Tahapan Berikutnya	29

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur asam 1-4 linked 8-D-manuronat (M) dan asam L-guluronat (G)	7
Gambar 2.2 Gambaran proses ikatan ion Ca^{2+} dengan dua struktur alginat tipe (G) asam α -L-guluronat	8
Gambar 4.1 Skema tahapan kerja penelitian	12
Gambar 5.1 Hasil pemeriksaan morfologi mikrosfer ovalbumin-alginat diproduksi teknik aerosolisasi dengan menggunakan mikroskop optik	19
Gambar 5.2 Morfologi mikrosfer ovalbumin- alginat diproduksi dengan aerosolisasi menggunakan SEM	20
Gambar 5.3 Hasil pemeriksaan morfologi mikrosfer ovalbumin-alginat dengan <i>drop method</i>	21
Gambar 5.4 Ukuran partikel mikrosfer ovalbumin-alginat dari formula menggunakan sambung silang CaCl_2 yang diproduksi dengan aerosolisasi	21
Gambar 5.5 Ukuran partikel mikrosfer ovalbumin-alginat dari formula menggunakan sambung silang BaCl_2 yang diproduksi dengan aerosolisasi	22
Gambar 5.6 Profil pelepasan Ovalbumin dari Mikrosfer Alginat dari B dan C	26
Gambar 5.7 Profil pelepasan ovalbumin dari mikrosfer ovalbumin-alginat dari formula C dan F	27
Gambar 5.8 Profil Pelepasan Ovalbumin dari Mikrosfer Alginat dengan sambung silang BaCl_2 metode aerosolisasi dari formula I dan J	28
Gambar 5.9 Proses pembuatan mikrosfer ovalbumin-alginat	35
Gambar 5.10 Thermoshaker untuk uji pelepasan	36
Gambar 5.11 Freeze dryer Eyla untuk proses pengeringan	36

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran I. Instrumen	35
Lampiran II. Personalia Tenaga Ahli Beserta Kualifikasinya	37

BAB I. PENDAHULUAN

M I B I E
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1.1. Latar belakang

Usaha mempertahankan stabilitas antigen dalam penggunaan vaksin secara oral merupakan permasalahan yang masih terus dipelajari. Vaksin adalah sediaan mengandung zat antigenik yang mampu menimbulkan kekebalan aktif dan khas pada manusia (Farmakope Indonesia IV, 1995). Rute vaksinasi umumnya parenteral karena sifat vaksin yang tidak stabil pada saluran cerna jika diberikan secara oral, serta pemakaiannya yang berulang membuat kepatuhan masyarakat menggunakan vaksin cenderung kecil. Oleh karena itu sistem penghantaran vaksin yang memberikan efek *prolonged immunity* walau hanya dengan pemberian tunggal dari antigen saat ini mulai dikembangkan (Slobbe et al. 2003).

Ovalbumin merupakan protein globular yang terdiri dari 385 asam amino dengan berat molekul 43 kDa (Croguennec et al. 2007), bertindak sebagai antigen yang merangsang sistem imunitas tubuh yang bersifat *poor immunogenic* sehingga perlu diaplikasikan berulang, untuk itu dibuat model mikrosfer untuk memberikan efek *sustained release* (D.T. O'hagan et al. 1991). Penggunaan vaksin peroral memiliki kelebihan yaitu cara pemakaian mudah sehingga tidak memerlukan tenaga ahli dan berkurangnya efek samping yang timbul (Benoit, Baras et al. 1999).

Mikroenkapsulasi merupakan proses penyalutan atau pelapisan partikel dengan polimer sehingga dihasilkan mikrosfer atau mikropartikel (1-1000 μm). Mikrosfer berfungsi sebagai sistem penghantaran antigen yang ampuh untuk antigen yang telah dijemak, sehingga memiliki potensi cukup besar sebagai sistem pelepasan antigen terkendali untuk induksi jangka panjang respon imun.

Ionotropic gelation merupakan salah satu metode mikroenkapsulasi berdasar pada kemampuan polielektrolit untuk bisa menyambung silang terhadap *counter ions* sehingga membentuk hidrogel dengan *drop method* dan aerosolisasi. Metode ini digunakan untuk enkapsulasi sel dan obat karena sederhana, cepat dan *cost-effective* (Yeo et al. 2001). Seluruh polielektrolit pada metode ini bersifat larut air sehingga protein dapat dienkapsulasi tanpa pelarut organik atau peningkatan suhu sehingga dapat menjaga stabilitas protein (Yeo et al. 2001).

Alginate adalah biopolimer alami dari polisakarida bercabang linier yang mengandung residu asam 1,4-linked- β -D-mannuronat dan residu asam α -L-guluronat dalam jumlah yang

bervariasi (Gombotz and SF.Weese 1998). Natrium alginat bersifat biokompatibel, biodegradabel dan non-toksik (Yang et al., 2011). Penambahan kation divalen menyebabkan terjadinya sambung silang terhadap polimer dan membentuk gel (Coradin, Bah et al. 2004)(Coradin and Livage. 2003). Ba^{2+} dan Ca^{2+} adalah ion yang paling sering digunakan karena Ba^{2+} menghasilkan ikatan yang kuat dengan alginat, sementara Ca^{2+} bersifat non-toksik (Patil et al. 2010). Perbedaan jenis penyambung silang berpengaruh terhadap karakteristik dan pelepasan ovalbumin. Penelitian ini dilakukan untuk mengoptimasi alginat mikrosfer dengan model vaksin antigen ovalbumin dengan beberapa penyambung silang dari dua metode enkapsulasi (*drop method* dan aerosolisasi) yang diharapkan bermanfaat untuk pengembangan sediaan vaksin oral.

1.2. Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh perbedaan kadar natrium alginat terhadap karakteristik fisik (bentuk, ukuran partikel, dan penampakan permukaan) dan kandungan ovalbumin di dalam sistem mikrosfer antigen ovalbumin.
2. Bagaimana pengaruh perbedaan kadar dan jenis penyambung silang terhadap karakteristik fisik (bentuk, ukuran partikel, dan penampakan permukaan) dan kandungan ovalbumin di dalam sistem mikrosfer antigen ovalbumin.
3. Bagaimana menentukan jumlah model vaksin antigen ovalbumin yang lepas dari alginat mikrosfer yang diproduksi dari metode aerosolisasi dan *drop method*.
4. Bagaimana profil pelepasan ovalbumin dari alginat mikrosfer.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang Vaksin

Vaksin didefinisikan sebagai olahan yang mengandung zat antigen yang menimbulkan kekebalan yang aktif dan spesifik terhadap agen infeksi (USP Guideline Vol 3.1, 2007). Penelitian tentang vaksin oral dalam hal proses produksi serta stabilitasnya masih banyak dipelajari dalam rangka mendapatkan sediaan vaksin oral yang optimal untuk menanggulangi berbagai jenis penyakit tropis. Peta perjalanan penelitian ini bermaksud mempelajari tentang hal tersebut dan menawarkan solusi terbaiknya seiring dengan rencana induk penelitian (RIP) Universitas Airlangga dalam bidang kesehatan dan obat.

2.2. Tinjauan tentang Ovalbumin

Model vaksin antigen yang digunakan dalam penelitian ini adalah ovalbumin. Ovalbumin adalah monomer, globular fosfolipoprotein yang dapat bertindak sebagai antigen yang akan merangsang sistem imunitas tubuh. Ovalbumin bersifat *poor immunogenic* sehingga perlu diaplikasikan berkali-kali, untuk itu dibuat model mikrosfer untuk memberikan efek *sustained release*.

2.3. Tinjauan tentang Mikroenkapsulasi dan Mikrosfer

Mikroenkapsulasi merupakan suatu proses untuk memberi lapisan (*coating*) kapsul pada droplet dengan tujuan tertentu yang menghasilkan mikropartikel sferis (mikrosfer) berukuran 1-1000 mikron (Umer *et al.*, 2011). Mikropartikel yang berbentuk sferis disebut sebagai mikrosfer (Birnbbaum and Peppas, 2003) yang dapat berfungsi sebagai sistem penghantaran antigen yang ampuh untuk suatu antigen yang telah dijebak. Karena kemampuan mereka untuk terdegradasi perlahan secara *in vivo* dan melepaskan antigen yang terjebak, mikrosfer memiliki potensi yang cukup besar sebagai sistem pelepasan antigen secara terkendali untuk induksi jangka panjang respon imun. (D.T. O'hagan *et al.* 1991).

2.3.1 Kegunaan Mikroenkapsulasi

Teknologi mikroenkapsulasi pertama kali dilakukan untuk tujuan kefarmasian oleh Bungenburg de Jong dan Kaas pada tahun 1931. Hingga saat ini, teknologi mikroenkapsulasi

telah berkembang pesat dan banyak digunakan oleh industri untuk mengatasi permasalahan stabilitas ataupun sistem penghantaran obat.

Menurut Swarbrick, 1984, alasan dilakukannya mikroenkapsulasi yaitu:

1. Untuk melindungi bahan yang reaktif dari pengaruh lingkungan
2. Untuk mengubah bahan aktif cair menjadi sistem padatan kering
3. Untuk memisahkan komponen yang tidak kompatibel
4. Untuk menutupi sifat yang tidak diinginkan dari komponen
5. Untuk melindungi lingkungan dari bahan aktif
6. Untuk mengontrol pelepasan bahan aktif berupa lepas tunda (*delayed release*) atau lepas lambat (*sustained release*)

2.4. Tinjauan tentang Metode Pembuatan Mikrosfer

Beberapa metode yang dapat digunakan untuk menghasilkan mikrosfer dengan protein antara lain penguapan pelarut, koaservasi (pemisahan fase), *spray drying*, gelasi ionotropik, *supercritical fluid precipitation*. Yeo et al (2001) berhasil memproduksi mikrosfer dengan dengan metode gelasi ionotropik dengan beberapa keuntungan yaitu efektif, sederhana, dan efektif biaya. Beberapa metode pembuatan mikrosfer antara lain:

1. Penguapan/Ekstraksi Pelarut (*Solvent Evaporation/Extraction*)

Metode ini banyak digunakan pada pembuatan mikrosfer untuk banyak jenis peptida dan protein serta obat-obatan yang bersifat hidrofobik (Yeo *et al.*, 2001). Proses menghilangkan pelarut adalah dengan menguapkan atau mengekstraksi pelarut tersebut setelah sebelumnya dimasukkan dalam sejumlah besar air. Dengan menggunakan proses ini, mikrosfer yang dihasilkan menjadi lebih porus dibandingkan dengan cara penguapan. Hal ini mengakibatkan pelepasan obat menjadi lebih cepat sehingga jarang diaplikasikan untuk membuat sediaan *sustained release*. Selain itu, metode ini dinilai kurang efisien dan banyak menggunakan solven yang toksik sehingga tidak banyak digunakan. Berdasarkan jenis emulsi yang dibuat dalam proses pembuatan mikrosfer, metode ini terbagi menjadi dua, yaitu:

a. Metode *Single Emulsion (o/o atau o/w)*

Pada metode ini, protein yang akan menjadi inti mikrosfer berada dalam fase terdispersi yaitu larutan polimer dalam pelarut organik. Bahan obat atau protein bisa dalam bentuk terlarut atau masih dalam bentuk fase terdispersi.

Pelarut organik yang biasa digunakan adalah diklorometan atau etil asetat. Sedangkan polimer seperti *Polylactic acid (PLA)* dan *Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)* merupakan polimer yang biasa digunakan untuk pembuatan mikrosfer *sustained release* (Yeo *et al.*, 2001). Larutan atau suspensi ini kemudian ditambahkan ke dalam fase kontinyu berupa minyak (o/o) atau air (o/w) yang telah mengandung pengemulsi seperti Span 85 dan aluminium stearat. Pelarut kemudian dihilangkan dan mikrosfer dikumpulkan dengan sentrifus atau filtrasi dan dikeringkan dengan metode *freeze drying*.

b. Metode *Double Emulsion (w/o/w)*

Untuk metode ini dilakukan tahap pengemulsian larutan obat ke dalam polimer yang sudah dilarutkan dalam pelarut organik. Kemudian, emulsi w/o ini ditambahkan ke dalam fase kontinyu yang telah berisi pengemulsi sehingga terbentuk sistem w/o/w. Pelarut kemudian dihilangkan dengan metode penguapan atau ekstraksi. Salah satu contohnya adalah enkapsulasi Leuprolide asetat yang merupakan agonis *Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH)* dengan polimer PLGA (75/25).

2. Pemisahan Fase/Koaservasi (*Phase Separation/Coacervation*)

Dalam metode koaservasi, ditambahkan suatu zat tertentu pada polimer yang telah dilarutkan sehingga menjadi tidak larut dan mengendap. Metode ini dilakukan dengan meneteskan larutan bahan obat dalam polimer dengan jarum ke dalam larutan penyambung silang kemudian dibiarkan hingga terbentuk mikropartikel dengan ukuran tertentu (Dahiya *et al.* 2011). Koaservasi banyak digunakan untuk pembuatan mikrosfer obat yang larut air seperti protein, peptida dan vaksin. Menurut Yeo *et al.* (2001), metode ini memiliki keuntungan untuk bahan-bahan tersebut karena campuran obat-polimer tidak langsung terkena fase *continuous aqueous* sehingga meminimalkan kehilangan obat yang larut dalam air. Dengan demikian, efisiensi enkapsulasi akan menjadi lebih tinggi. Namun, kelemahan dari metode ini yaitu mikrosfer yang dihasilkan cenderung beragregasi dan proses *scale-up* untuk produksi menjadi lebih sulit.

3. *Spray Drying*

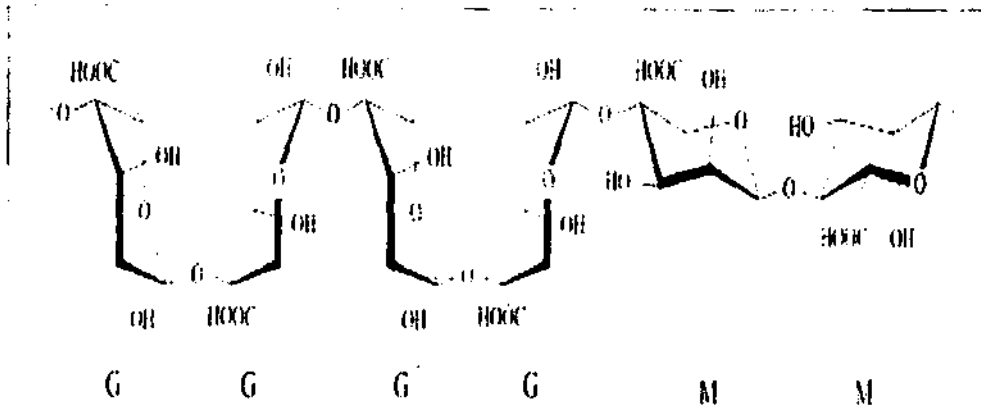
Metode *spray drying* banyak digunakan dalam bidang kefarmasian, makanan ataupun industri biokimia. Prosesnya meliputi pendispersian obat dalam pelarut yang telah mengandung polimer. Campuran tersebut kemudian disemprotkan dan dikeringkan dengan gas pembawa panas (Swarbrick dan Boylan, 2007). Mikrosfer padat yang dihasilkan akan terkumpul di bagian bawah. Kelemahan dari metode ini adalah banyaknya bahan yang mungkin hilang selama proses *spray drying* dilakukan. Selain itu, metode ini terbatas untuk konsentrasi polimer tertentu karena cairan dengan viskositas tinggi tidak memungkinkan untuk disemprotkan.

4. *Ionotropic Gelation*

Ionotropic gelation merupakan metode yang melibatkan penyambungan silang dari polielektrolit dengan *counter ion* multivalensi. Metode dilakukan dengan menambahkan larutan penyambung silang ke dalam larutan polimer dengan muatan yang berlawanan (Swarbrick dan Boylan, 2007). Keuntungan dari metode ini adalah menghasilkan mikrosfer yang lembut, mudah, cepat dan *cost-effective*. Selain itu, tidak perlu menggunakan pelarut organik ataupun menaikkan temperatur sehingga mengurangi kemungkinan kerusakan terhadap protein. Terdapat dua teknik dalam pembuatan mikrosfer dengan metode ini, yaitu metode drop yang menggunakan jarum (*syringe*) serta metode aerosolisasi yang menggunakan alat penyemprot (*spray*).

2.5 Tinjauan Tentang Alginat

Alginat adalah polisakarida alami yang dapat ditemukan pada dinding sel banyak spesies ganggang coklat. Asam alginat merupakan polisakarida tipe poliuronida yang tersusun atas perbedaan perbandingan unit asam beta-D-manuronat (M) dan asam alfa-L-guluronat (G), yang diikat oleh ikatan beta-1-4 dan alfa-1-4. Struktur asam manuronat dan asam guluronat dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 Struktur asam 1-4 linked 8-D-manuronat (M) dan asam L-gulonat (G) (Strand *et al.*, 2000)

Alginat dapat membentuk gel melalui proses sambung silang dengan ion divalen seperti Ca^{2+} , Sr^{2+} dan Ba^{2+} atau ion trivalen seperti Fe^{3+} dan Al^{3+} . Dengan sifatnya yang demikian, alginat dapat digunakan pada pengembangan mikroenkapsulasi dan berfungsi sebagai agen pelindung untuk *prolonged release* makromolekul sensitif seperti protein dan peptida (Rawat *et al.*, 2008).

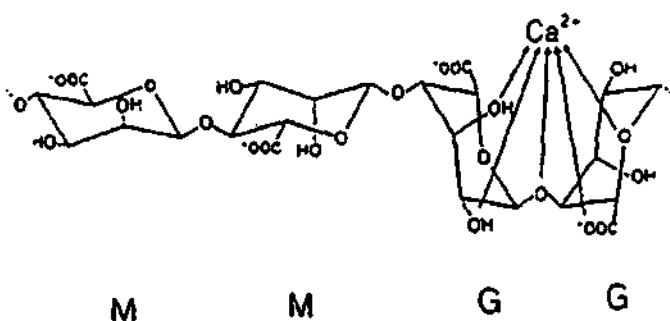
Natrium alginat merupakan serbuk tidak berbau dan tidak berasa, berwarna putih hingga coklat kekuningan (Rowe *et al.*, 2009). Natrium alginat praktis tidak larut dalam etanol (95%), eter, kloroform, dan campuran etanol/air dengan kandungan etanol lebih besar dari 30%. Selain itu, praktis tidak larut dalam pelarut organik lain dan larutan yang bersifat asam yang pH-nya kurang dari 3. Natrium alginat paling stabil dalam pH 4-10 dan di bawah pH 3 akan mengalami presipitasi. Larut perlahan dalam air dan membentuk larutan yang viskus. Larutan natrium alginat 1% dalam air pada suhu 20°C memiliki viskositas 20-400 mPas dan akan berkurang apabila larutan di atas pH 10. Natrium alginat inkompatibel dengan derivat akridin, kristal violet, fenilmerkuri asetat dan sitrat, garam kalsium, logam berat dan etanol dengan konsentrasi lebih dari 5%. Alginat dapat digunakan sebagai pembentuk gel, pengental (pengikat air), pengemulsi, penstabil, dan bahan pembentuk filmstrip (Rasyid, 2005).

2.6 Tinjauan Tentang Kalsium Klorida (CaCl_2)

Kalsium klorida berbentuk serbuk kristal putih/tak berwarna, granul, atau massa kristal, dan bersifat higroskopis. Dapat dalam bentuk anhidrat (CaCl_2) dengan berat molekul 110,98,

bentuk dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dengan berat molekul 147.0, dan bentuk heksahidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) dengan berat molekul 219.1. Kalsium klorida larut bebas dalam air dan etanol 95%, tidak larut dalam dietil eter. Kalsium klorida inkompatibel dengan larutan karbonat, fosfat, sulfat, dan tartrat. Dapat bereaksi dengan bromin trifluorida, dan reaksi dengan Zn dapat melepaskan gas hidrogen yang bersifat eksplosif (Rowe, *et al.*, 2009).

Pada pembuatan mikrosfer dengan alginat, kalsium klorida digunakan sebagai penyambung silang (*cross-linking*). Ion Ca^{2+} dapat berikatan dengan asam guluronat yang menjadi salah satu penyusun alginat dan membentuk formasi jaringan tiga dimensi yang diistilahkan sebagai 'egg-box' (Jin *et al.*, 2009). Proses ikatan ion Ca^{2+} dengan dua struktur alginat tipe (G) asam α -L-guluronat dapat dilihat pada gambar 2.2 berikut ini.



Gambar 2.2 Gambaran proses ikatan ion Ca^{2+} dengan dua struktur alginat tipe (G) asam α -L-guluronat (Erdinc.2007).

2.7 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi dalam Formulasi Mikrosfer

Faktor-faktor yang mempengaruhi formulasi mikrosfer antara lain:

1. Kadar Natrium Alginat sebagai Polimer

Kadar polimer dapat mempengaruhi karakteristik mikrosfer yang dihasilkan. Menurut Manjanna *et al.*, 2010, peningkatan kadar natrium alginat dapat menghasilkan mikrosfer yang lebih sferis. Namun kadar yang terlalu tinggi juga dapat menyebabkan larutan polimer-obat menjadi sangat viskus sehingga sulit keluar dari alat penyemprot. Akibatnya ukuran mikrosfer yang dihasilkan menjadi lebih besar.

Peningkatan kadar polimer juga berpengaruh terhadap pelepasan obat. Kadar polimer yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan kerapatan matriks polimer sehingga laju pelepasan obat menurun.

2. Konsentrasi Larutan Sambung Silang

Pengaruh konsentrasi CaCl_2 sebagai larutan sambung silang yaitu meningkatkan hasil mikrosfer yang terbentuk apabila konsentrasi CaCl_2 meningkat tetapi konsentrasi yang terlalu besar menyebabkan terbentuknya mikrosfer yang tidak rata. Namun konsentrasi yang terlalu kecil dapat menghasilkan mikrosfer yang mudah pecah (Jin *et al.*, 2009).

3. Waktu Sambung Silang (*Cross-Linking Time*)

Peningkatan waktu sambung silang dapat menghasilkan mikrosfer yang lebih sferis dan sedikit menyebabkan ukuran partikel menjadi lebih kecil (Smrdel *et al.*, 2008). Namun peningkatan tersebut juga dapat menyebabkan efisiensi penjebakan bahan obat oleh polimer menjadi lebih kecil.

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

1. Menentukan pengaruh perbedaan konsentrasi natrium alginat dan penyambung silang ($BaCl_2$ dan $CaCl_2$) terhadap karakteristik fisik (bentuk, ukuran partikel, dan penampakan permukaan) di dalam sistem mikrosfer antigen ovalbumin yang dibuat menggunakan metode aerosolisasi dan drop method.
2. Menentukan jumlah ovalbumin yang lepas dari alginat mikrosfer yang diproduksi dari metode aerosolisasi dan drop method dan profil pelepasan ovalbumin dari alginat mikrosfer.

3.2. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat yang signifikan serta kontribusi terhadap kajian ilmu pengetahuan khususnya dibidang kefarmasian tentang pengembangan sediaan vaksin oral yang stabil dan memberikan respon imunitas yang tinggi dalam penanggulangan penyakit tropis di Indonesia serta ditargetkan juga dapat memberikan kontribusi kepada pengembangan riset dan terapan di rumah sakit tropis Universitas Airlangga.

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Bahan dan Alat

4.1.1 Bahan

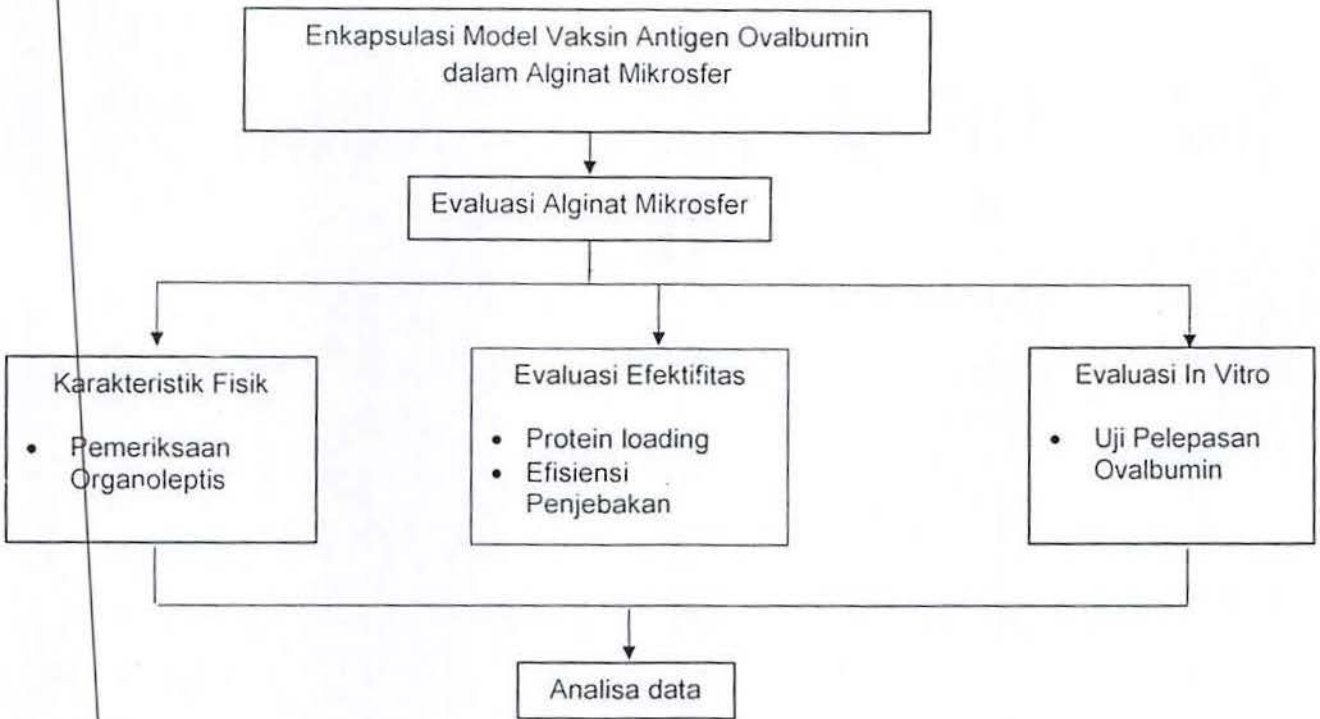
Ovalbumin *pharmaceutical grade* (Sigma-Aldrich Inc.); Natrium alginat *pharmaceutical grade* dan BaCl_2 *pharmaceutical grade* (Sigma-Aldrich Inc.); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ *pharmaceutical grade* (Solvay Chemicals International); Natrium sitrat *pharmaceutical grade* (Weifang Ensign Industry Co. Ltd.); Na_2HPO_4 *pro analisis* (Merck); KH_2PO_4 *pro analisis* (Merck); NaCl *pro analisis* (Merck); HCl *pro analisis* (Merck); NaOH *pro analisis* (Merck); *Protein Quantification Kit* (Sigma-Aldrich Inc.); Aquadest.

4.1.2 Alat

Double-beam Spectrophotometer (UV-1800 Shimadzu), *Thermoshaker* (Gerhardt), *Differential Thermal Apparatus/DTA* (Mettler Toledo FT 900 *Thermal System*), *Spray aerosol, syringe and needle*, buret titrasi, spektrofotometer FTIR (Perkin Elmer Instrument), neraca analitik (Chyo Balance Serial 51347), *Sentrifuge* (Rotofix-32), *Stirrer plate* (Dragon Lab MS-Pro), Mikroskop optik (Axioskop 40-Zeiss), pH meter (Eutech Instrument pH 700), *Scanning Electron Microscope* (Fei Inspect S50), alat penyemprot dengan lubang 35 μm (*spray*), *Freeze Dryer* (Eyela FD-81), statif, alat-alat gelas

4.2. Metode Kerja

Metode penelitian yang dilakukan tahapannya adalah karakterisasi polimer, model vaksin antigen, penyambung silang: pembuatan alginat mikrosfer dengan dua metode berbeda serta dengan dua jenis penyambung silang yang berbeda diikuti dengan pemeriksaan organoleptis dan karakterisasi: evaluasi efisiensi penjebakan ovalbumin serta pelepasan ovalbumin dari alginat mikrosfer yang terbentuk. Gambaran tahapan penelitian ditunjukkan oleh gambar 4.1.



Gambar 4.1 Skema tahapan kerja penelitian

4.2.1. Identifikasi Ovalbumin, Natrium Alginat, CaCl_2 , BaCl_2

4.2.1. Pemeriksaan organoleptis dilakukan terhadap bentuk, warna dan bau.

4.2.2. Identifikasi dengan mengamati suhu lebur dengan alat DTA FP 900 *Thermal System*

4.2.3. Pemeriksaan spektra inframerah dengan teknik pellet KBr

4.3. Formula Mikrosfer Ovalbumin

4.3.1. Metode aerosolisasi

Mikrosfer dibuat dengan metode aerosolisasi dengan menggunakan suatu perangkat penyemprot dengan ukuran lubang kecil dengan konsentrasi natrium alginat yang berbeda yaitu 1%, 1.5% dan 2.5% b/v. Larutan ovalbumin-alginat dalam air disemprotkan dengan kecepatan konstan ke dalam larutan penyambung silang menggunakan *spray*. Kemudian dilakukan pengadukan selama 2 jam pada kecepatan 1000 rpm. Mikrosfer yang terbentuk dikumpulkan dan dicuci dari larutan sambung silang kemudian dicuci dengan aquadest lalu dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 6 menit. Suspensi mikrosfer kemudian dikeringkan dengan freeze dryer.

4.3.2. Drop Method

Mikrosfer dibuat dengan *drop method* menggunakan suatu perangkat penyemprot (dari syringe atau buret titrasi) dengan menjatuhkan larutan natrium alginat dengan konsentrasi berbeda yaitu 1%, 1.5% dan 2.5% b/v. Larutan ovalbumin-alginat dalam air dijatuhkan dengan kecepatan konstan ke dalam larutan penyambung silang. Kemudian dilakukan pengadukan selama 2 jam pada kecepatan 1000 rpm. Mikrosfer yang terbentuk dikumpulkan dan dicuci dari larutan sambung silang kemudian dicuci dengan aquadest lalu dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 6 menit. Suspensi mikrosfer kemudian dikeringkan.

Formula ovalbumin-alginat mikrosfer dengan kedua metode dapat dilihat pada tabel

4.1.

Tabel 4.1. Formula Ovalbumin-Alginat Mikrosfer

Larutan Penyambung Silang (M)		Aerosolisasi			Drop Method		
		Alginat (%)			Alginat (%)		
		1	1.5	2.5	1	1.5	2.5
BaCl ₂	0.1						
	0.25						
	0.5						
	1.5						
CaCl ₂	0.1						
	0.25						
	0.5						
	1.5						

4.4. Evaluasi Fisik Ovalbumin-Alginat Mikrosfer

4.4.1. Distribusi Ukuran Partikel

Dilakukan dengan menggunakan mikroskop optik.

1. Skala okuler dikalibrasi dengan cara:

- Mikrometer okuler dan objektif dipasang pada tempatnya.
- Kedua skala diamati sampai terlihat jelas di bawah mikroskop.
- Garis awal skala okuler dengan garis awal skala objektif dihimpitkan, kemudian ditentukan garis yang tepat berhimpit pada kedua skala.
- Harga skala okuler ditentukan, misalnya 9 skala okuler = 10 skala objektif, maka 1 skala okuler = $10/9$ skala objektif.

2. Mikrosfer yang akan diamati diletakkan di atas objek glass.
3. Mikrometer objektif diambil, diganti dengan objek glass yang berisi sampel, kemudian dimulai pengukuran diameter partikel.
4. Dilakukan pengelompokan: ditentukan ukuran partikel terkecil dan terbesar dari seluruh sampel, dibagi ke dalam beberapa interval dan kelas.
5. Ditentukan harga diameter rata-rata dan dibuat kurva distribusi ukuran partikel.

4.4.2. Bentuk dan Permukaan Mikrosfer

Untuk melihat bentuk dan permukaan dari mikrosfer ovalbumin yang dihasilkan dilakukan dengan menggunakan mikroskop optik dan penampakan diambil dengan menggunakan kamera. Selain itu dapat juga dilakukan pengamatan dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM). Pemeriksaan dengan SEM memberikan resolusi yang lebih tinggi dibandingkan dengan mikroskop optik.

4.5. Kandungan Kuantitatif Ovalbumin dalam Mikrosfer

Protein Assay

1. Disiapkan larutan standar protein atau larutan uji yang akan diukur
2. Ditambahkan 2.5 ml larutan CBB ke dalam tabung uji
3. Ditambahkan 50 μ l larutan standar protein, kemudian campur dengan homogen
4. Campuran larutan dipindahkan ke *cell* dan hitung absorbansi larutan pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer
5. Seluruh prosedur diatas diulangi dengan larutan standar pada konsentrasi yang berbeda, kemudian dibuat kurva kalibrasinya
6. Ditambahkan 50 μ l larutan sampel ke dalam tabung uji
7. Ditambahkan 2.5 ml larutan CBB ke dalam tabung uji yang sama
8. Dipindahkan campuran larutan ke *cell* dan dihitung absorbansi larutan pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer
9. Ditentukan konsentrasi protein dalam larutan sampel dengan menggunakan kurva kalibrasi

4.6. Protein Loading

Cara menentukan protein loading yaitu:

1. Disiapkan 400 mg sampel alginat mikrosfer.

2. Ditambahkan 50 ml larutan sodium sitrat pH 8.5 dalam sampel mikrosfer dan diaduk selama 12 jam pada kecepatan 1000 rpm.
3. Larutan jernih yang dihasilkan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ovalbumin.

4.7. Metode Pelepasan In Vitro

Sejumlah mikrosfer setara dengan 400 mg ovalbumin dimasukkan ke dalam tabung pelepasan berisi 100 ml larutan HCl pH 1.2 diaduk pada suhu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ kecepatan 100 rpm. Dilakukan pengambilan sampel sejumlah 5 ml setiap interval waktu tertentu dan digantikan dengan larutan medium baru sejumlah volume yang diambil. pengambilan cuplikan sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum ovalbumin. Setelah 2 jam dalam HCl pH 1.2. media pelepasan diadjust pHnya dengan menambahkan 10,6 gram Na_2HPO_4 , 1,5 gram KH_2PO_4 dan 2 ml NaOH hingga mencapai pH 7.4. Pengambilan sampel sejumlah 5 ml setiap interval waktu tertentu dilakukan hingga 6 jam dalam PBS. Jumlah bahan aktif yang lepas dihitung dalam setiap satuan waktu.

4.8. Pengolahan Data

4.8.1. Distribusi Ukuran Partikel

Distribusi mikrosfer ukuran mikrosfer setiap formula dibandingkan setelah dihitung diameter rata – ratanya dengan rumus :

$$D \text{ rata-rata} = \frac{\sum nd}{\sum n}$$

Keterangan:

n = jumlah mikropartikel yang diamati

d = ukuran mikropartikel

(Dhakar et al., 2010)

4.8.2. Analisis Data

Data dari masing – masing pemeriksaan dianalisis secara statistik dengan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) jenis rancangan *Completely Randomized Design* (CRD) dengan menggunakan program SPSS *for Windows Evaluation Version*.

Rancangan ini dapat digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna antar formula dengan membandingkan harga F hitung terhadap F tabel dengan derajat

kepercayaan (α) = 0.05. Jika dari analisis diperoleh hasil F hitung lebih besar dari F tabel, maka terdapat perbedaan bermakna antar formula.

Perhitungan dilanjutkan dengan uji *Honestly Significant Difference* (HSD) untuk mengetahui formula mana saja yang berbeda. Adanya perbedaan bermakna antar dua formula dipenuhi bila harga selisih rata-rata dua formula lebih besar daripada hasil perhitungan harga HSD (Daniel, 2005).

$$HSD = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{MSE}{n}}$$

Keterangan :

- $q_{\alpha, k, N-k}$: harga q tabel pada (k, N-k)
- α : derajat kepercayaan ($\alpha = 0.05$)
- k : banyaknya kelompok (numerator)
- $N - k$: derajat bebas *within groups* (denominator)
- MSE : MSE pada uji anova CRD
- N : pengamatan dalam tiap kelompok

4.9. Luaran Penelitian

Luaran Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi ini antara lain berupa kajian teoritis keilmuan farmasetika khususnya dibidang kefarmasian dalam bentuk publikasi ilmiah.

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Pemeriksaan Kualitatif Bahan

5.1.1 Ovalbumin

Hasil pemeriksaan kualitatif ovalbumin dapat dilihat pada tabel 5.1

Tabel 5.1 Pemeriksaan kualitatif ovalbumin

Pemeriksaan	Pengamatan	Pustaka
Organoleptis	Serbuk putih kekuningan, bau khas putih telur	Warna hampir putih atau coklat kekuningan
Analisis Termal (dengan DTA)	161.4°C	100-180°C
Spektrum IR	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)
Amida I	1643.24	1655
Amida II	1546.8	1530
Amida III	1242.07	1236
Rantai samping	1450.37	1450
	1400.22	1390
	1161.07	1163
	516.89	519

5.1.2 Natrium Alginat

Hasil pemeriksaan kualitatif natrium alginat dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Pemeriksaan kualitatif natrium alginat

Pemeriksaan	Pengamatan	Pustaka
Organoleptis	Serbuk kuning kecoklatan, tidak berbau, tidak berasa	Serbuk berserat, putih hingga putih kekuningan, tidak berbau atau praktis tidak berbau, tidak berasa
Analisis Termal (dengan DTA)	230.0°C	240.0°C
Spektrum IR	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)
Gugus garam karboksilat	1627.81	1620
	1419.51	1420
Struktur sakarida :		
C – O stretching	1315.36	1320
	1095.49	1090
	948.91	950
C – O – C stretching	1029.92	1020

5.1.3 CaCl₂

Hasil pemeriksaan kualitatif CaCl₂ dapat dilihat pada tabel 5.3

Tabel 5.3 Pemeriksaan kualitatif CaCl₂

Pemeriksaan	Pengamatan	Pustaka
Organoleptis	Serpihan putih, keras, tidak berbau	Granul atau serpihan, putih, keras, tidak berbau
Analisis Termal (dengan DTA)	190.0-203.4°C	180-200°C

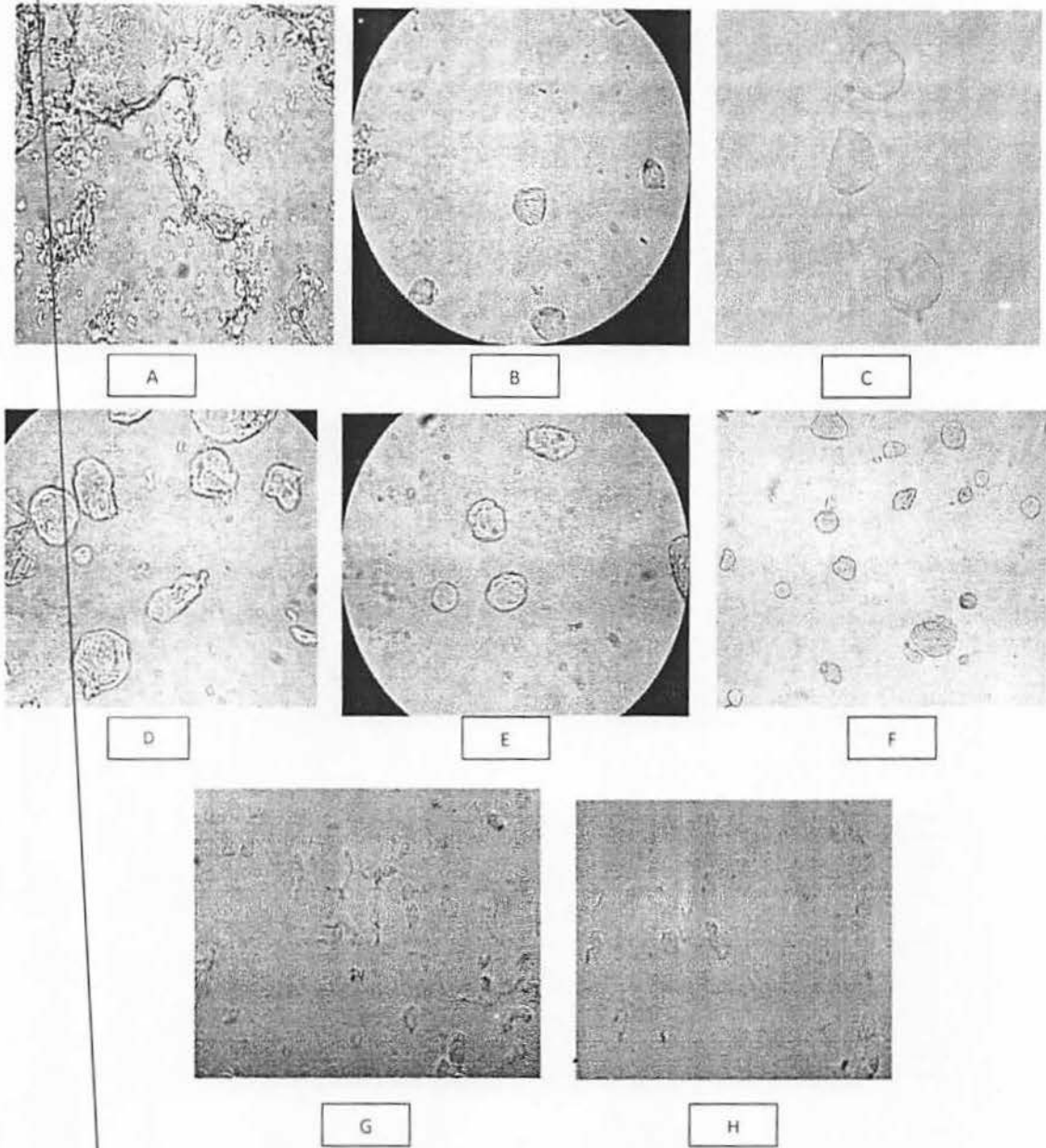
Hasil analisa kualitatif ovalbumin secara organoleptis menunjukkan bahwa ovalbumin yang digunakan sesuai dengan data ovalbumin yang terdapat pada pustaka. Pada uji analisis thermal menggunakan alat DTA didapatkan jarak lebur 161.4°C. Hal ini sesuai dengan pustaka bahwa jarak lebur ovalbumin adalah 100-180°C (Nakamura *et al.*, 1997). Pada pemeriksaan spektrum inframerah ovalbumin, seluruh pita serapan spesifik ovalbumin yang teramati sesuai dengan pita serapan spesifik ovalbumin dalam pustaka (Guler *et al.*, 2013). Pada spektrum inframerah alginat terdapat beberapa pita serapan spesifik dan telah sesuai dengan pustaka. Dari data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa bahan yang digunakan untuk penelitian sesuai dengan pustaka, sehingga dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut. Hasil analisa kualitatif natrium alginat dan CaCl₂ secara organoleptis dan uji kualitatif juga menunjukkan bahwa natrium alginat dan CaCl₂ yang digunakan sesuai dengan data yang terdapat pada pustaka.

5.2 Hasil Pemeriksaan Karakteristik Mikrosfer Ovalbumin-Alginat

5.2.1 Hasil Pemeriksaan Morfologi Mikrosfer Metode Aerosolisasi

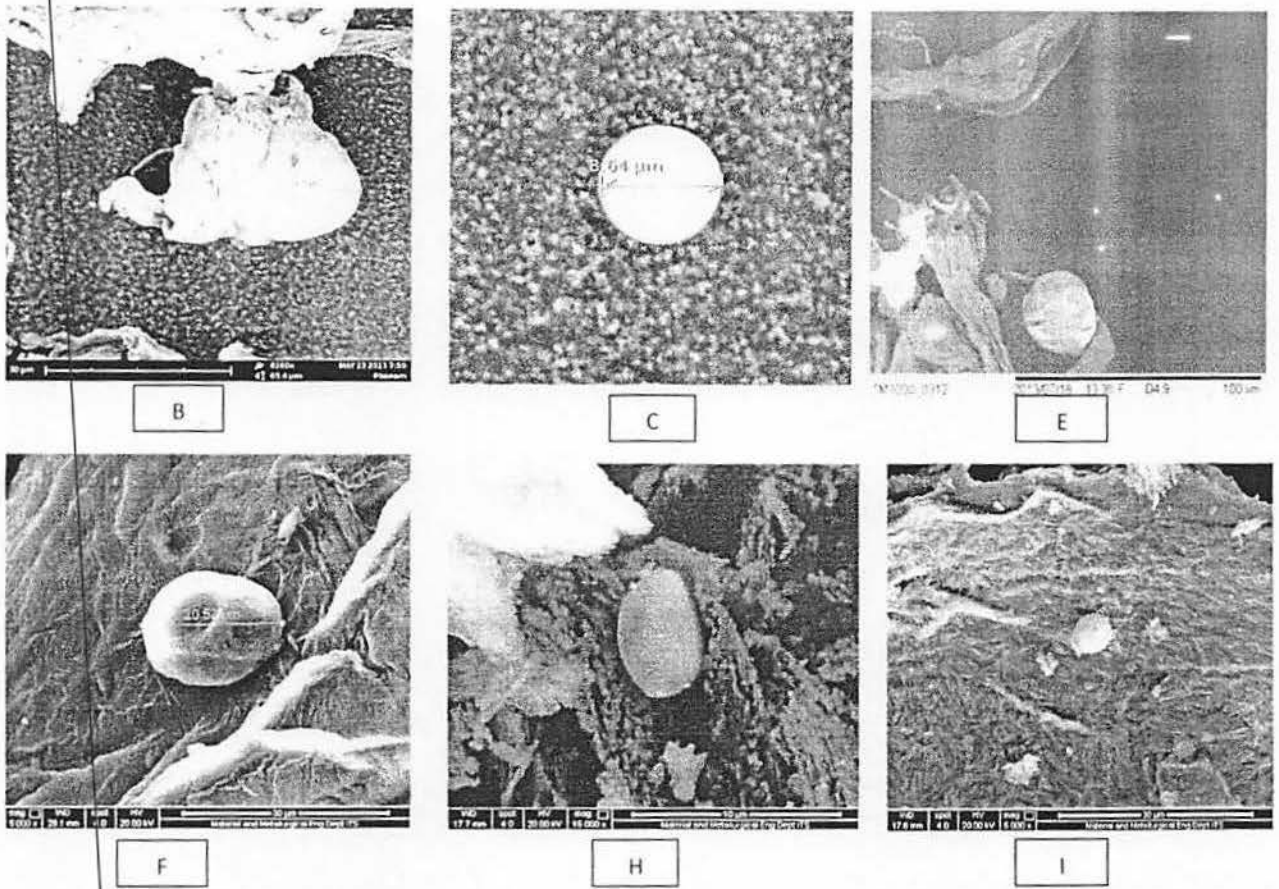
Hasil pemeriksaan morfologi mikrosfer dengan mikroskop dan *Scanning Electron Microscope* dapat dilihat berturut-turut pada gambar 5.1 dan gambar 5.2. Dari hasil pemeriksaan dengan mikroskop optik, dapat dilihat bahwa mikrosfer yang diproduksi menggunakan alginat (konsentrasi 1 dan 1.5%) dan CaCl₂ (0.25: 0.5: 1.5M) menunjukkan bentuk partikel yang sferis, tetapi hal ini tidak nampak pada mikrosfer yang dibentuk dengan konsentrasi CaCl₂ yang rendah yaitu 0.1M yang hanya menghasilkan bentukan benang panjang bukan mikrosfer (gambar 5.1), sedangkan yang dibentuk dari alginat konsentrasi tinggi 2.5% dan CaCl₂ (0.1M sampai 1.5M) dapat membentuk mikrosfer yang sferis.

Pada mikrosfer yang menggunakan larutan sambung silang $BaCl_2$ (0.1; 0.25; 0.5 dan 1.5M) dan alginat (1; 1.5 dan 2.5%), semua formula dapat membentuk mikrosfer yang hampir sferis atau sferis meski beberapa formula permukaannya masih kasar.



Gambar 5.1. Hasil pemeriksaan morfologi mikrosfer ovalbumin-alginat diproduksi teknik aerosolisasi dengan menggunakan mikroskop optik.

- | | |
|---|---|
| A Formula mikrosfer dengan alginat 1.5% dan $CaCl_2$ 0.1M | B Formula mikrosfer dengan alginat 1.5% dan $CaCl_2$ 0.5M |
| C Formula mikrosfer dengan alginat 1.5% dan $CaCl_2$ 1.5M | D Formula mikrosfer dengan alginat 2.5% dan $CaCl_2$ 0.1M |
| E Formula mikrosfer dengan alginat 2.5% dan $CaCl_2$ 0.5M | F Formula mikrosfer dengan alginat 2.5% dan $CaCl_2$ 1.5M |
| G Formula mikrosfer dengan alginat 1% dan $BaCl_2$ 0.25M | H Formula mikrosfer dengan alginat 1% dan $BaCl_2$ 1.5M |



Gambar 5.2. Morfologi mikrosfer ovalbumin- alginat diproduksi dengan aerosolisasi menggunakan SEM

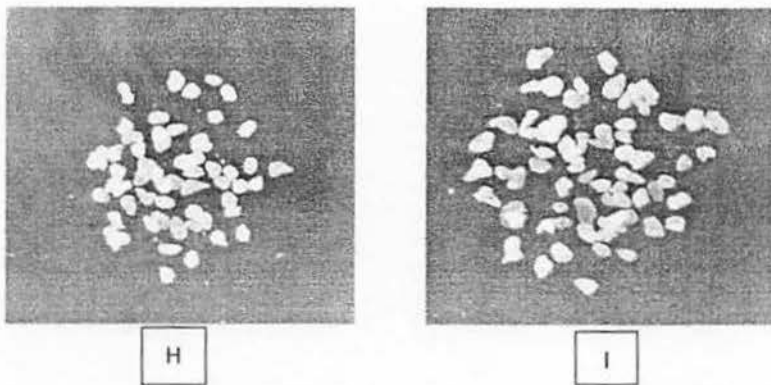
- | | |
|--|--|
| B Formula mikrosfer dengan alginat 1.5% dan CaCl_2 0.5M | C Formula mikrosfer dengan alginat 1.5% dan CaCl_2 1.5M |
| E Formula mikrosfer dengan alginat 2.5% dan CaCl_2 0.5M | F Formula mikrosfer dengan alginat 2.5% dan CaCl_2 1.5M |
| H Formula mikrosfer dengan alginat 1% dan BaCl_2 1.5M | I Formula mikrosfer dengan alginat 1.5% dan BaCl_2 1.5M |

Dengan pemeriksaan SEM menunjukkan morfologi dari permukaan mikrosfer ovalbumin-alginat yang dihasilkan metode ini mendekati halus, sferis, dan beraturan (gambar 5.2). Terutama pada formula yang dibuat dengan konsentrasi larutan sambung silang CaCl_2 yang lebih tinggi (1.5 M) pada semua konsentrasi alginat (1-2.5%). Hasil yang menarik dari pemeriksaan SEM ini adalah morfologi dari formula mikrosfer yang diproduksi dengan larutan sambung silang BaCl_2 mempunyai permukaan yang lebih halus, sferis dan ukuran yang lebih kecil dibanding saat pengukuran dengan mikroskop optik. Ini kemungkinan disebabkan sambung silang Ba^{2+} cenderung lebih menstabilkan mikrosfer dibandingkan dengan mikrosfer yang menggunakan Ca^{2+} . Hal ini juga terlihat dari serbuk mikrosfer dengan BaCl_2 hasil proses pengeringan dengan freeze drying warnanya lebih putih bersih dibandingkan serbuk mikrosfer dengan CaCl_2 yang warnanya putih kekuningan. Beberapa

permukaan mikrosfer yang kasar dan tidak beraturan kemungkinan disebabkan karena faktor pengeringan dengan teknik *freeze drying* yang menggunakan suhu yang sangat ekstrim sehingga seharusnya ditambahkan bahan yang dapat melindungi proses liofilisasi yang disebut *lyoprotectant* atau *cryoprotectant* seperti golongan gula (sukrosa, laktosa, dll).

5.2.2 Hasil Pemeriksaan Morfologi Mikrosfer Metode Drop Method

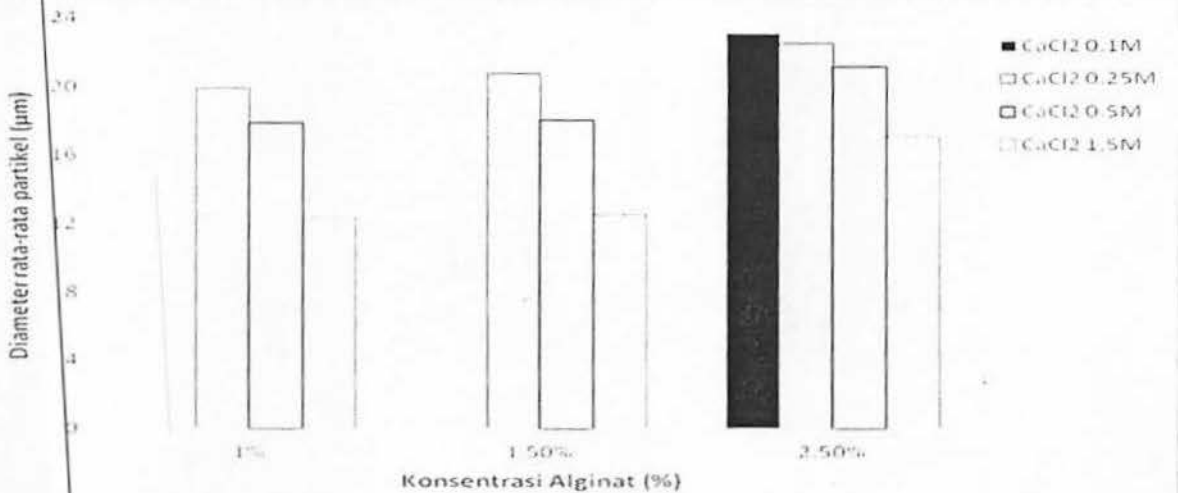
Untuk pembuatan dengan drop method, morfologi mikrosfer dapat dilihat dengan jelas pada gambar 5.3. Dengan metode ini, hampir semua mikrosfer yang dihasilkan berbentuk sferis dan mendekati halus saat mikrosfer basah, namun saat dikeringkan mikrosfer ovalbumin-alginat menjadi agak kasar.



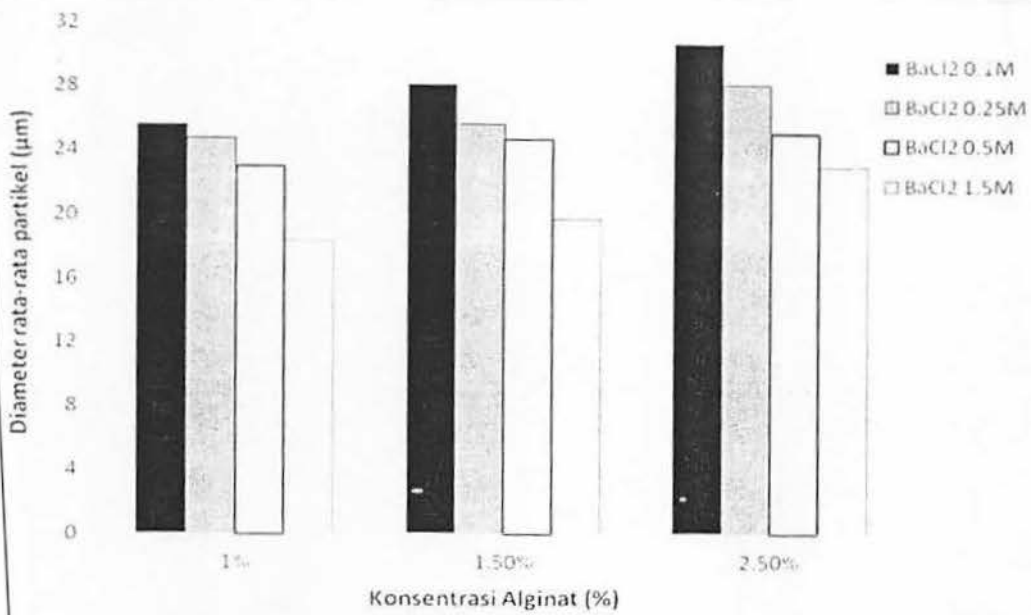
Gambar 5.3. Hasil pemeriksaan morfologi mikrosfer kering ovalbumin-alginat-BaCl₂ dengan drop method

5.3. Hasil Pemeriksaan Ukuran Partikel

Hasil pemeriksaan ukuran partikel disajikan pada gambar 5.4 dan 5.5 serta tabel 5.4.



Gambar 5.4. Ukuran partikel mikrosfer ovalbumin-alginat dari formula menggunakan sambung silang CaCl₂ yang diproduksi dengan aerosolisasi



Gambar 5.5. Ukuran partikel mikrosfer ovalbumin-alginat dari formula menggunakan sambung silang BaCl₂ yang diproduksi dengan aerosolisasi

Tabel 5.4. Ukuran partikel mikrosfer ovalbumin-alginat dari formula yang diproduksi dengan *drop method*

Larutan Penyambung Silang (M)		Diameter rata-rata (mm)		
		Konsentrasi Alginat (%)		
		1	1.5	2.5
BaCl ₂	0.1 – 1.5M	1-2 mm	2-3 mm	2-3 mm
CaCl ₂	0.1 – 1.5M	1-2 mm	2-3 mm	2-3 mm

Pemeriksaan ukuran mikrosfer yang diproduksi dengan kedua teknik dilakukan dengan metode mikroskop optik. Berdasarkan hasil pengukuran untuk mikrosfer yang diproduksi dengan aerosolisasi menggunakan larutan sambung silang CaCl₂ dan BaCl₂, mikrosfer yang dihasilkan memiliki diameter rata-rata ukuran partikel antara 12 µm hingga 30 µm (gambar 5.4 dan 5.5). Hasil ini telah memenuhi rentang ukuran yang diinginkan yaitu sekitar 10 – 30 µm (Mishra, 2008). Hal ini menurut penelitian sebelumnya disebutkan bahwa respon imun yang baik diperoleh dengan rute peroral dari mikrosfer alginat dengan rentang ukuran 1-30 µm. Dari data diameter rata-rata ukuran partikel diperoleh data bahwa ukuran partikel yang diproduksi dengan konsentrasi sambung silang yang tinggi adalah lebih kecil dibanding jika konsentrasi sambung silangnya lebih rendah. Hal ini disebabkan dengan peningkatan kadar Ca²⁺ juga akan membentuk mikrosfer yang lebih kecil, sferis (Manjanna, *et al.*, 2010). Hasil

ini senada dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Joshi *et al* (2012) dan Singh dan Kumar (2012). Sedangkan untuk konsentrasi polimer alginat, diketahui bahwa meningkatnya konsentrasi alginat (dari 1% ke 2.5%) akan meningkatkan ukuran partikelnya. Hal ini dapat dikaitkan dengan terjadinya peningkatan viskositas larutan polimer pada kadar yang lebih tinggi, sehingga menghasilkan droplet yang lebih besar saat dilakukan proses aerosolisasi yang menyebabkan ukuran mikrosfer yang dihasilkan menjadi lebih besar (Manjana *et al*, 2010).

Untuk mikrosfer alginat yang diproduksi menggunakan *drop method*, formula mikrosfer yang menggunakan larutan sambung silang alginat (CaCl_2 dan BaCl_2) dan alginat dengan konsentrasi rendah (1%) memiliki ukuran droplet berukuran 1-2mm (tabel 5.4), sedangkan dengan peningkatan konsentrasi alginat (1.5-2.5%), ukurannya meningkat menjadi 2-3mm. Ini dapat dijelaskan dengan semakin meningkatnya viskositas polimer sehingga droplet yang dihasilkan meningkat ukurannya.

5.4. Hasil pemeriksaan efisiensi pengebakan, kandungan protein dan yield mikrosfer

Hasil pemeriksaan efisiensi enkapsulasi, kandungan ovalbumin dalam mikrosfer dan yield dapat dilihat pada tabel 5.5.

Tabel 5.5. Pemeriksaan Efisiensi Pengebakan, Kandungan Protein dan Yield Formula Ovalbumin-Alginat Mikrosfer dengan metode aerosolisasi

Larutan Penyambung Silang (M)	EP(%)			Protein loading (%)			Yield (%)			
	Conc Alginat (%)			Conc Alginat (%)			Conc Alginat (%)			
	1	1.5	2.5	1	1.5	2.5	1	1.5	2.5	
BaCl_2	0.1	31.22 ± 1.50	38.75 ± 2.10	70.32 ± 2.50	33.39 ± 3.20	33.47 ± 1.03	68.70 ± 2.21	25.20 ± 2.05	45.97 ± 1.80	51.18 ± 5.20
	0.25	38.56 ± 2.44	41.97 ± 3.25	62.79 ± 5.32	37.39 ± 1.55	43.52 ± 1.44	53.86 ± 3.04	31.52 ± 0.06	49.92 ± 10.22	58.20 ± 2.20
	0.5	52.65 ± 2.10	87.32 ± 1.50	40.79 ± 3.25	49.98 ± 2.10	80.76 ± 8.20	22.09 ± 1.86	49.47 ± 3.44	67.58 ± 6.20	92.8 ± 2.44
	1.5	59.45 ± 3.15	89.2 ± 1.05	35.28 ± 4.10	58.02 ± 5.12	89.49 ± 4.30	9.14 ± 2.15	73.18 ± 3.60	99.90 ± 0.15	92.8 ± 4.30
CaCl_2	0.1	-	-	49.42 ± 8.22	-	-	49.58 ± 3.11	-	-	42.32 ± 7.28
	0.25	6.22 ± 0.20	5.04 ± 0.68	58.24 ± 2.35	18.12 ± 1.06	19.10 ± 2.20	68.73 ± 2.50	22.53 ± 2.86	33.60 ± 3.44	42.37 ± 2.26
	0.5	22.51 ± 2.26	38.31 ± 8.38	67.18 ± 8.03	18.76 ± 0.20	20.60 ± 5.78	70.10 ± 9.93	23.38 ± 0.13	33.56 ± 2.62	51.84 ± 6.29
	1.5	30.84 ± 0.60	63.75 ± 4.33	88.80 ± 0.52	36.00 ± 0.35	64.22 ± 8.82	74.50 ± 1.70	61.18 ± 3.26	62.30 ± 3.90	75.29 ± 8.56

Hasil perhitungan efisiensi penjebakan mikrosfer ovalbumin – alginat menunjukkan bahwa peningkatan kadar larutan sambung silang CaCl_2 menyebabkan peningkatan persentase efisiensi penjebakan ovalbumin dalam mikrosfer (tabel 5.5). Peningkatan persentase efisiensi penjebakan karena tersedianya lebih banyak ion Ca^{2+} yang berikatan dengan gugus karboksilat pada struktur asam guluronat alginat sehingga terbentuk *crosslink* alginat - Ca^{2+} yang lebih banyak sehingga makin banyak ruang penjebakan ovalbumin (Gulati, *et al.*, 2011). Fenomena ini juga terjadi pada peningkatan konsentrasi alginat dari 1% ke 2.5% menunjukkan hasil bahwa peningkatan kadar polimer natrium alginat menyebabkan peningkatan efisiensi penjebakan ovalbumin dalam mikrosfer. Peningkatan ini terjadi karena kadar polimer natrium alginat yang lebih tinggi menyediakan lebih banyak tempat ikatan untuk ion Ca^{2+} sehingga memungkinkan untuk menjebak lebih banyak ovalbumin (Manjana *et al.*, 2010). Studi yang serupa juga menghasilkan tren yang sama pada Joshi *et al.*, 2012 dan penelitian Singh dan Kumar, 2012.

Hasil yang serupa dapat dilihat pada formula mikrosfer dengan sambung silang BaCl_2 dan alginat dengan konsentrasi 1 dan 1.5%, tetapi pada satu kondisi dimana konsentrasi alginat sangat tinggi (2.5%), efisiensi penjebakannya menurun hingga 50% dengan meningkatnya konsentrasi BaCl_2 (dari 0.1 hingga 1.5M). Hal ini kemungkinan disebabkan jumlah dari alginat yang terlalu berlebihan akan mungkin menghambat terdistribusinya bahan sambung silang secara homogen yang dapat mengakibatkan penurunan efisiensi penjebakannya (Ramachandran *et al.*, 2011).

Peningkatan kandungan ovalbumin dengan adanya pengaruh konsentrasi larutan sambung silang CaCl_2 menunjukkan peningkatan kadar larutan sambung silang CaCl_2 menyebabkan peningkatan persentase kandungan ovalbumin dalam mikrosfer. Hal ini karena tersedianya lebih banyak ion Ca^{2+} yang berikatan dengan gugus karboksilat pada struktur asam guluronat alginat sehingga terbentuk *crosslink* alginat dengan Ca^{2+} yang lebih banyak sehingga makin banyak ruang untuk ovalbumin dalam mikrosfer (Gulati *et al.*, 2011). Sedangkan peningkatan kadar polimer natrium alginat dapat meningkatkan kandungan ovalbumin dalam mikrosfer. Peningkatan ini disebabkan karena pada kadar natrium alginat tinggi dengan waktu sambung silang yang cukup, dihasilkan derajat sambung silang yang lebih kuat (Manjana *et al.*, 2010), sehingga jumlah ovalbumin yang dapat dijebak semakin besar dan kandungan ovalbumin dalam mikrosfer meningkat (tabel 5.5) Fenomena penurunan kandungan ovalbumin yang sangat signifikan dengan meningkatnya konsentrasi

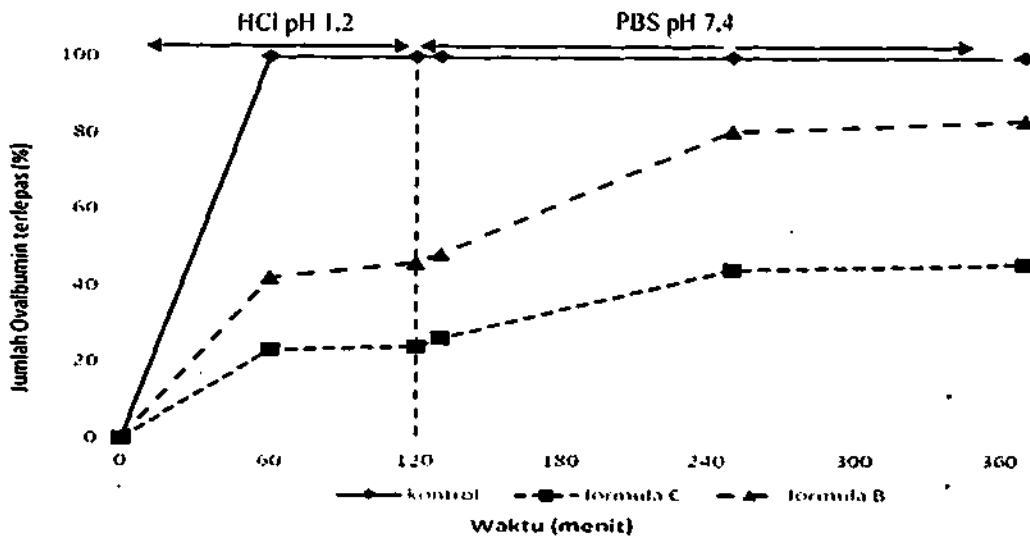
BaCl₂ (dari 0.1 hingga 1.5M) pada formula yang mengandung jumlah polimer berlebih juga diakibatkan ketidakhomogenan pendistribusian molekul sambung silang dengan molekul alginat (Ramachandran et al. 2011).

Dari hasil analisis pengaruh konsentrasi larutan sambung silang CaCl₂ maupun BaCl₂ terhadap yield menunjukkan bahwa peningkatan kadar larutan sambung silang menyebabkan peningkatan persentase *yield* (perolehan kembali) mikrosfer. Hal ini karena tersedianya lebih banyak ion Ca²⁺ atau Ba²⁺ yang berikatan dan terbentuk *crosslink alginat - Ca²⁺* atau Ba²⁺ yang lebih banyak sehingga *yield* (perolehan kembali) yang dihasilkan meningkat (Jin et al., 2009). Untuk peningkatan kadar polimer natrium alginat menyebabkan peningkatan perolehan kembali mikrosfer yang dihasilkan akibat tersedianya lebih banyak tempat ikatan untuk ion Ca²⁺ atau Ba²⁺ sehingga terbentuk sambung silang alginat-Ca²⁺ atau alginat-Ba²⁺ yang lebih banyak (Manjana et al. 2010).

Untuk formula mikrosfer yang diproduksi dengan *drop method*, mikrosfer yang dihasilkan sulit untuk dihitung efisiensi penjebaran, kandungan ovalbumin dan *yield* dikarenakan mikrosfernya membutuhkan waktu yang sangat lama untuk pengeringan biasa pada suhu kamar. Untuk pengeringan dengan freeze drying, mikrosfer alginat yang diproduksi dengan *drop method* ini mengalami perubahan bentuk yang sangat signifikan yaitu berubah menjadi partikel yang menggumpal.

5.5 Hasil Pemeriksaan Uji Pelepasan Ovalbumin dari Mikrosfer Alginat

Selanjutnya dilakukan uji pelepasan untuk mendapatkan profil pelepasan ovalbumin dari mikrosfer terbaik, ditinjau dari mikrosfer dengan ukuran partikel yang lebih kecil serta mempertimbangkan efisiensi penjebaran, kandungan ovalbumin dan *yield* yang tertinggi yaitu mikrosfer dengan konsentrasi alginat 1.5% dan 2.5% menggunakan sambung silang 1.5M CaCl₂. Hasil pemeriksaan uji pelepasan ovalbumin dari mikrosfer alginat dalam formula B dan C dapat dilihat pada gambar 5.6.



Formula B : Formula dengan konsentrasi alginat 2.5% dan CaCl_2 1.5M
 Formula C : Formula dengan konsentrasi alginat 1.5% dan CaCl_2 1.5M

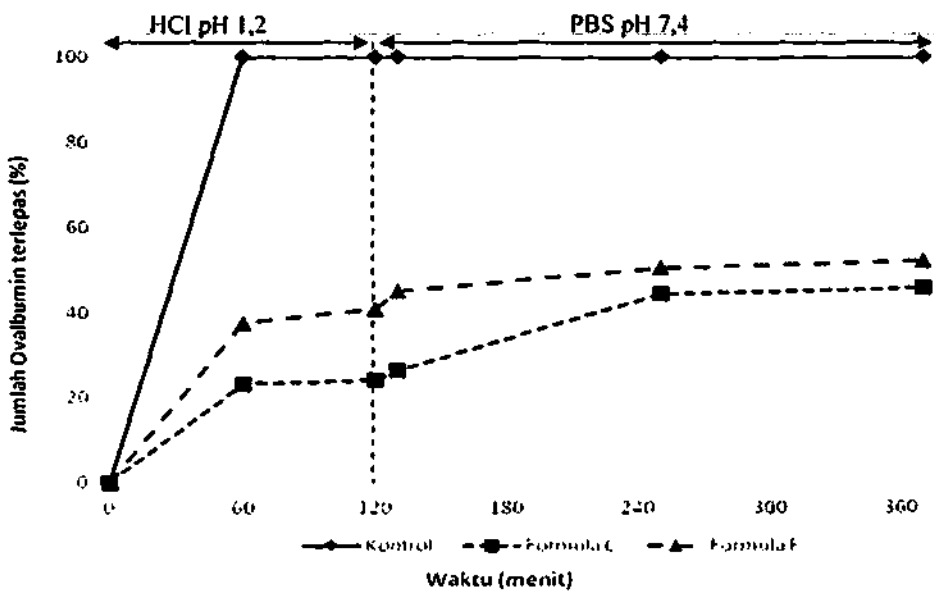
Gambar 5.6. Profil pelepasan ovalbumin dari mikrosfer formula B dan C

Dari hasil pelepasan pada gambar 5.6. jumlah ovalbumin yang terlepas pada C kurang dari 25% setelah inkubasi 2 jam di HCl pH 1,2, sedangkan pelepasan ovalbumin dari mikrosfer dengan alginat yang lebih tinggi (B) sebesar 48,31%. Setelah mikrosfer berada pada media pH 7,4, jumlah ovalbumin yang terlepas dari mikrosfer formula B (84,59%) lebih besar dibanding C (45,65%) setelah 370 menit sehingga dapat disimpulkan bahwa C mampu menghasilkan pelepasan ovalbumin yang lebih lambat dan lebih kecil dibandingkan dengan formula B yang pelepasannya lebih cepat dan besar.

Fenomena pelepasan kedua formula ini memang sedikit unik. Beberapa kemungkinan penyebab besarnya jumlah ovalbumin yang terlepas pada formula B antara lain dengan adanya pemaparan atau inkubasi mikrosfer pada pH asam dan kemudian pH 7,4 pada mikrosfer alginat yang mungkin ikatan egg-box dari polimer alginat dan CaCl_2 dapat mengubah struktur ikatan sehingga mengubah kemampuan mengembang dari mikrosfer ini yang berdampak pada meningkatnya jumlah ovalbumin yang lepas dari formula B (Soni *et al.*, 2011). Kemungkinan lain penyebabnya adalah pada formula B, kadar alginat yang digunakan lebih besar dari C yaitu 2,5%. kadar alginat yang lebih besar menyebabkan larutan alginat yang akan disemprotkan kedalam larutan sambung silang menjadi lebih viskous, hal ini menyebabkan CaCl_2 susah berpenetrasi kedalam tetesan alginat sehingga reaksi sambung

silang yang terjadi kurang sempurna dan menghasilkan mikrosfer yang lebih rapuh (Tavakol *et al.* 2013). Mikrosfer yang rapuh tersebut menyebabkan ovalbumin lebih mudah terlepas dari mikrosfer.

Dari hasil pelepasan tersebut terpilih formula mikrosfer terbaik dengan pelepasan lebih lambat adalah formula yang diproduksi dengan polimer alginat konsentrasi 1.5% dan CaCl_2 1.5M (formula C). Ditinjau dari ukuran mikrosfer yang dihasilkan, formula mikrosfer ini memang memiliki ukuran partikel terkecil yaitu 12.54 μm . Selanjutnya untuk mengetahui apakah pelepasan ovalbumin lebih lambat dan jumlah yang lepas lebih sedikit dengan adanya perbedaan konsentrasi sambung silang CaCl_2 , maka dilakukan uji pelepasan lanjutan seperti gambar 5.7. menggunakan formula terbaik alginat 1.5% dengan perbedaan konsentrasi CaCl_2 yaitu 1.5M (C) dibandingkan dengan formula F yang mengandung CaCl_2 0.5M (F).



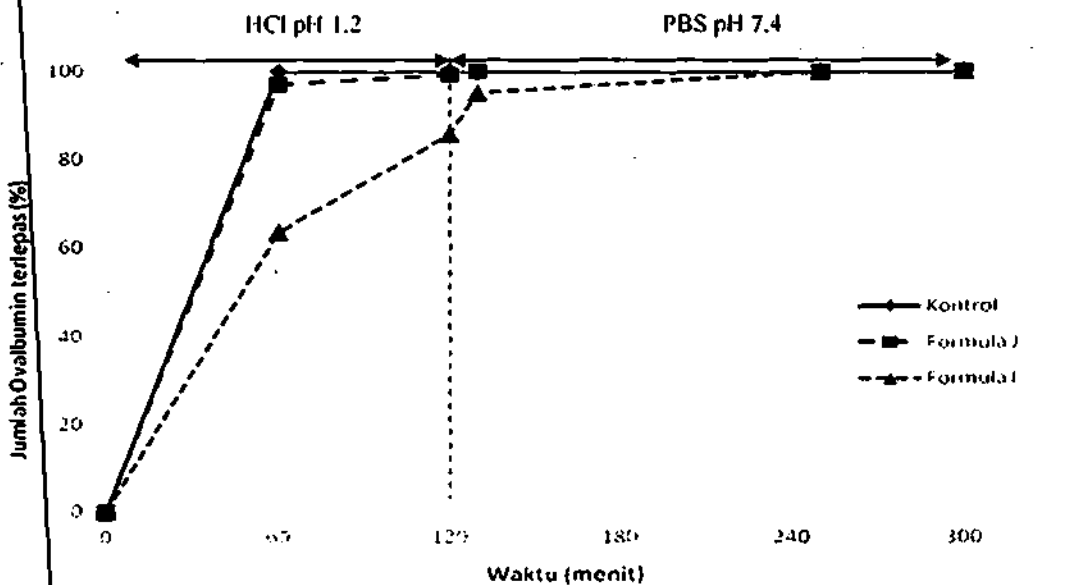
Formula C : Formula dengan konsentrasi alginat 1.5% dan CaCl_2 1.5M
 Formula F : Formula dengan konsentrasi alginat 1.5% dan CaCl_2 0.5M

Gambar 5.7 Profil pelepasan ovalbumin dari mikrosfer ovalbumin-alginat dari formula C dan F

Dari gambar 5.7 didapatkan jumlah ovalbumin yang lepas dari mikrosfer alginat tidak memberikan perbedaan signifikan antara formula yang diproduksi dengan CaCl_2 konsentrasi rendah (0.5M) maupun konsentrasi tinggi (1.5M). Hal ini dapat terjadi karena pengaruh dari *swelling* mendadak pada mikrosfer sesaat setelah masuk ke dalam larutan HCl pH 1,2 (Nithitanakool *et al.*, 2013). Berdasarkan hasil perhitungan laju pelepasan, semua mikrosfer

ovalbumin-Ca-alginat ini memiliki laju pelepasan yang lebih kecil dibandingkan ovalbumin kontrol. Hal ini membuktikan bahwa mikrosfer Ca-alginat yang dibentuk dengan metode *ionotropic gelation* teknik aerosolisasi ini mampu melindungi ovalbumin dalam pH asam (hanya 20-40% yang lepas) dan tetap melepaskan ovalbumin secara perlahan pada media PBS pH 7.4.

Untuk membandingkan pengaruh jenis sambung silang terhadap pelepasan ovalbumin, selanjutnya formula mikrosfer ovalbumin-alginat menggunakan sambung silang BaCl_2 dengan konsentrasi 1.5M (formula I) dan 0.5M (formula J) dan konsentrasi alginat 1.5% diuji pelepasannya (gambar 5.8). Selain itu, kedua formula mikrosfer Ba-alginat ini juga mempunyai efisiensi penjebakan, kandungan ovalbumin dan yield yang cukup tinggi.



Formula I : Formula mikrosfer dengan konsentrasi alginat 1.5% dan BaCl_2 1.5M
 Formula J : Formula mikrosfer dengan konsentrasi alginat 1.5% dan BaCl_2 0.5M

Gambar 5.8 Profil Pelepasan Ovalbumin dari Mikrosfer Alginat dengan sambung silang BaCl_2 metode aerosolisasi dari formula I dan J

Jumlah ovalbumin yang larut dan lepas dari mikrosfer Ba-alginat memiliki fenomena yang berbeda dengan mikrosfer Ca-alginat. Ovalbumin dari mikrosfer Ba-alginat terutama dalam mikrosfer yang menggunakan sambung silang dengan konsentrasi kecil, didapatkan didapatkan bahwa ovalbumin tidak dapat dilindungi oleh mikrosfer pada suasana asam (pH 1.2) selama 2 jam inkubasi di HCl, sehingga lepas dalam jumlah besar dan dalam waktu yang

cepat yaitu hampir 100% lepas dalam waktu 1 jam pada pH 1.2 (formula J). Peningkatan konsentrasi sambung silang menunjukkan penurunan jumlah ovalbumin yang lepas dari mikrosfer (formula I) yaitu sekitar 65% setelah 1 jam inkubasi di HCl pH 1.2. Kejadian ini disebabkan mikrosfer Ba-alginat dengan konsentrasi sambung silang yang tinggi dapat menjebak ovalbumin lebih banyak didalam ikatan sambung silangnya yang lebih terstruktur, kuat dan rigid dapat mencegah terjadinya swelling mikrosfer lebih besar dibanding mikrosfer dengan konsentrasi sambung silang yang rendah (0.5M) (Jahan et al, 2012). Selain itu, mikrosfer Ba-alginat melepaskan ovalbumin lebih besar dan lebih cepat disbanding Ca-alginat kemungkinan disebabkan hubungan struktur interkoneksinya hanya bersifat sementara bukan permanent sehingga mikrosfernya sangat rapuh (Lin et al. 2003). Penyebab lain yang memungkinkan untuk dipelajari adalah perbedaan suhu pendinginan yang sangat signifikan yang terjadi disaat proses freeze-drying mikrosfer, sehingga mikrosfer mengalami pengkerutan dan pengecilan ukuran partikel (terlihat pada foto SEM), yang memungkinkan memperluas permukaannya sehingga jumlah ovalbumin yang dapat larut di media pelepasan bertambah besar. Oleh karena itu disarankan untuk preparasi mikrosfer yang menggunakan sambung silang $BaCl_2$, perlu ditambahkan bahan yang dapat melindungi ovalbumin selama proses pendinginan-pengeringan atau freeze-drying yang biasa disebut *Lyoprotectant*.

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Dari hasil penelitian ini nantinya, pada penelitian tahun selanjutnya akan dipilih formula alginat mikrosfer terbaik untuk dilanjutkan dengan pengujian integritas ovalbumin untuk memastikan kestabilannya dalam media asam sebagai simulasi dari kondisi asam lambung serta simulasi kondisi intestinal di usus yang merupakan simulasi kondisi di saluran cerna pada penggunaan oral. Selain itu rencana penelitian di tahun kedua adalah uji imunogenisitas per oral pada hewan coba untuk mempelajari profil peningkatan respon imunitas pada hewan coba setelah pemberian mikrosfer alginat dengan model vaksin antigen ovalbumin secara per oral. Rangkuman rencana tahapan berikutnya terlihat pada tabel 6.1.

Tabel 6.1. Rencana Tahapan Berikutnya

No	Waktu	Rencana Kegiatan
1	Tahun ke-2	Uji integritas ovalbumin protein dalam mikrosfer yang diproduksi dengan teknik aerosolisasi
2	Tahun ke-2	Uji respon imunitas dari ovalbumin yang lepas dari mikrosfer alginat melalui vaksinasi per oral secara in vivo menggunakan hewan coba.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Mikrosfer ovalbumin-alginat yang dihasilkan dari metode aerosolisasi dengan larutan sambung silang CaCl_2 maupun BaCl_2 memiliki ukuran partikel yang lebih kecil (12-30 μm) dibandingkan yang diproduksi dengan *drop method* (1-3 mm). Mikrosfer ovalbumin-alginat yang dihasilkan dengan teknik aerosolisasi dengan CaCl_2 dan BaCl_2 mempunyai efisiensi pengebakan, kandungan ovalbumin dan perolehan kembali mikrosfer yang tinggi.
2. Mikrosfer ovalbumin-alginat yang menggunakan sambung silang CaCl_2 diproduksi dengan teknik aerosolisasi menghasilkan laju pelepasan yang lambat yang sangat potensial untuk system penghantaran vaksin oral dibandingkan dengan yang menggunakan BaCl_2

7.2. Saran

Dari hasil penelitian ini, formula mikrosfer ovalbumin-alginat yang optimum dari teknik aerosolisasi ini perlu diuji integritas ovalbuminnya untuk menjamin stabilitas fisiknya serta diuji efektifitasnya secara *in vivo* sebagai salah satu sistem penghantaran antigen untuk vaksinasi per oral dengan menggunakan hewan coba. Untuk pembuatan mikrosfer dengan *drop method*, masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada proses pengeringan yang sesuai untuk ovalbumin.

Selain itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang faktor-faktor yang berpengaruh pada proses produksi mikrosfer teknik aerosolisasi mulai dari pembuatan hingga pengeringan misalnya pengaruh tekanan, jenis dan konsentrasi polimer, jenis dan konsentrasi larutan sambung silang, waktu sambung silang atau bahan *lyoprotectant* terhadap karakter fisik mikrosfer.

DAFTAR PUSTAKA

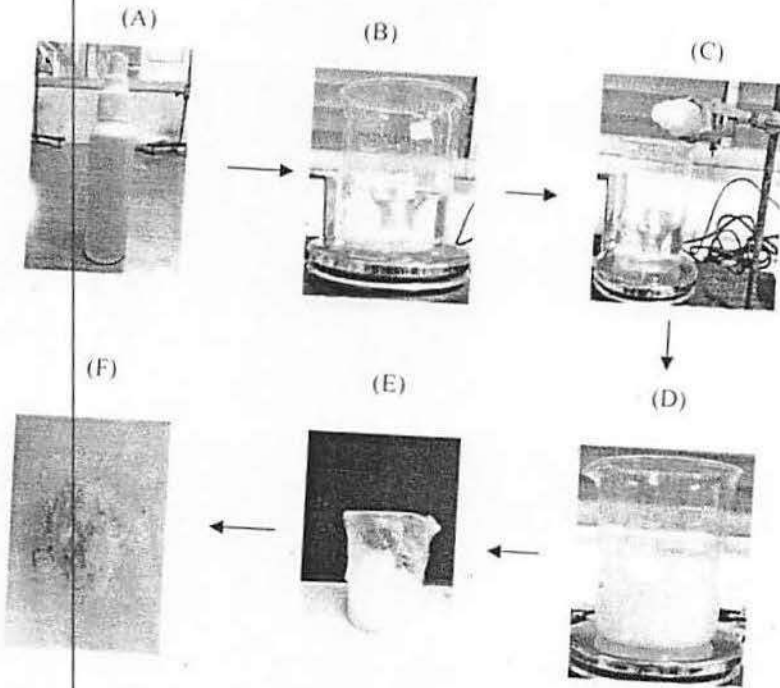
- Agnihotri, N., Ravinesh M., Chirag G., Manu A., (2012). Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery: A Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1-20
- Birnbaum, DT. Brannon-Peppas. L. (2003). *Microparticle drug delivery systems*. In: Brown DM, editor. Drug delivery systems in cancer therapy. Totowa: Humana Press Inc; 117-136.
- Benoit, M. A., B. Baras. (1999). Preparation and characterization of protein-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 184(1): 73-84.
- Coradin, T., S. Bah. (2004). Gelatine/silicate interactions: from nanoparticles to composite gels. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 35(1): 53-58.
- Croguennec, T., Renault, A., Beauvils, S., Dubois, J., Pezennec, S., (2007), Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 315(2): 627-636
- Dahiya S., Gupta OM., (2011). Formulation and In Vitro Evaluation of Metoprolol Tartrate Microspheres. *Bulletin of Pharmaceutical Research*. 1(1): 31-39
- Dubey, M., Shami, T.C. and Rao, K.U. Bhasker. 2009. Microencapsulation Technology and Applications. *Defence Science Journal*. 59(1): 82-95.
- Erdinc, B. I., (2007). Micro/Nanoencapsulation of proteins within alginate/chitosan matrix by spray drying. *Thesis*, Queen's University.
- Gombotz, W. and SF. Wee (1998). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Review* 31(3): 267-285.
- Gulati, N., Upendra N., Sharma, VK., Khosa, RL., (2011). Effect of Polymer and Cross Linking Agent on In Vitro Release of Quercetin from Microbeads. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*. 1-5
- Güler, T., Şahbudak, K., Çetinkaya, S. and Akdemir, Ü., (2013). An Electrochemical Study of Pyrite-Ovalbumin Interaction in Relation to Flotation. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 23 (9): 2766-2775
- Hariyadi, D.M., Wang, Y., Ma, Y. Bostrom, T., Malouf, J., Turner, M., Bhandari, B., Coombes, AGA., (2013). *Journal of Drug Delivery and Science Technology*. submitted.
- Jahan, ST, Sadat SMA, Islam MR, Azam Z. and Chowdhury JA. (2012). Effect of Various Electrolytes on Theophylline Loaded Sodium Alginate Beads Prepared by Ionic Cross Linking Technique. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 11(2): 181-189.
- Jin, M., Yanping Zheng, Qiaohong Hu., (2009). Preparation and characterization of bovine serum albumin alginate/chitosan microspheres for oral administration. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 215-220.
- Joshi, S., Patel, P., Lin, S. Anda Madan, P.L. (2012). *Development of Cross-Linked Alginate Spheres by Ionotropic Gelation Technique for Controlled Release of Naproxen Orally*. *Asian journal of Pharmaceutical Science*, 134 - 142.
- Yeboah, KG., and D'Souza, MJ., (2009). Evaluation of albumin microspheres as oral delivery system for Mycobacterium tuberculosis vaccines. *Journal of Microencapsulation*. 26(2): 166-179.

- Lin HR., Yeh Y.J. (2003). Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies. *Trans Technology Publication in Materials Sciences Forum*. 426-432: 3043-3048.
- Maria, M.S., Scher, Herbert, Jeoh, Tina. (2012). Microencapsulation of bioactives in cross-linked alginate matrix. *Journal of Microencapsulation*. 286-295.
- Manjanna, K. M., Kumar, T. M., Pramod, B., Shivakumar. (2010). Calcium alginate cross-linked polymeric microbeads for oral sustained drug delivery in arthritis. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 109-122.
- Mishra, NA, Goyal, K., Kapil K., Bhuvaneshwar V., Rishi P., Shivani R., Abhinav M., Shailja T., Shiva V., Vyas SP., (2008). Biodegradable Polymer Based Particulate Carrier(s) for the Delivery of Protein and Peptides. *Anti-Inflammatory & anti allergy Agent in Medical Chemistry*. 240-251.
- Morris, W., Mark C., Philip, K. (1994). Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation. *Vaccine* 12: 5-11.
- Mowat, A., Mcl. 1985. The Role of antigen recognition and suppressor cells in mice with oral tolerance to ovalbumin. *Immunology*. 253-260.
- Nakamura, K., Masafumi, K., Akihiko, T., Hideaki, M., Norio, M., (1997). Structure and dynamics of ovalbumin gels. *Rheology Acta*, 36: 252-261.
- Nithitanakool, S., Pithayanukul, P., Bourgeois, S., Fessi, H., Bavovada, R., (2013). The Development, Physicochemical Characterisation and in-Vitro Drug Release Studies of Pectinate Gel Beads Containing Thai Mango Seed Kernel Extract. *Molecules*, 18: 6504-6520.
- O'hagan, D.T., Rahman, D., Mcgee, J.P., Jefery, H., Davies, M.C., Williams, P., Davis, S.S. and Challacombe, S.J. (1991). Biodegradable microparticles as controlled release antigen delivery systems. *Immunology*. 239-242.
- O'neil, M. J., Patricia E. Heckelman, Cherie B. Koch, Kristin J. Roman, Catherine M. Kenny, Maryann R. D'Arecca. (2001). *The Merck Index: An Encyclopedia Of Chemical Drug And Biological*. 13th Ed., New Jersey : Merck & Co., inc.
- Patil, S., Kamalapur, MV., Marapur, SC., Kadam, DV., (2010). Ionotropic Gelation and PolyElectrolyte Complexation: The Novel Techniques To Design Hydrogel Particulate Sustained, Modulated Drug Delivery System: A Review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 5(1): 241-248.
- Putra, Joban, A.H., Bhushan Ashok Karode, Sudhir Bhaskar Chincholkar. (2011). Calcium alginate as supporting material for the immobilization of rifamycin oxidase from *Chryseobacterium* species. *Research Article. Biotechnology: Bioinformatic Bioengineering*. 529-535.
- Ramachandran, S., Nandhakumar S. and Dhanaraju M.D., (2011). Formulation and Characterization of Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan Biodegradable Microspheres Loaded with Famotidine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 10 (3): 309-316.
- Rasyid. (2005). Beberapa Catatan Tentang Alginat. *Oceana*. 3 (1): 9-14.
- Rawat M., Saraf S., (2008). Lipospheres: Emerging Carriers in The Delivery of Proteins and Peptides. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 1(3): 207- 214.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J. and Quinn, M.E. Eds. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipient*. 6th Ed. London: RPS Publishing. 89-90; 622-624.
- Singh, I. and Kumar, P., (2012). Formulation and optimization of tramadol loaded alginate beads using response surface methodology. *Pak. J. Pharm. Sci*. 25 (4): 741-749.

- Slobbe L, Medlicott N, Lockhart E, Davies N, Tucker I, Razzak M, Buchan G. (2003), A prolonged immune response to antigen delivered in poly (epsilon-caprolactone) microparticles. *Immunology Cell Biology*, 81(3):185-191.
- Smrdel, P., Marija, B., Ales, M., (2008). The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelation. *Sci. Pharm*, 76: 77-89.
- Soni, M. L., Kumar, M. and Namdeo, K. P., (2011). Sodium alginate microspheres for extending drug release: formulation and *in vitro* evaluation. *International Journal of Drug Delivery*, 2: 64-68.
- Strand, B.L., Morch, YRR.A., Skjak-Braek, G., (2000). Alginate as Immobilization Matrix for Cells. *Minerva Biotec*, 12: 23-33.
- Suksamran, T., Praneet O., Theerasak R., Tanasait N., Uracha R. dan Pitt S. (2009). Biodegradable alginate microparticles developed by electrohydrodynamic spraying techniques for oral delivery of protein. *Journal of Microencapsulation*, 563-570
- Swarbick, J., Boylan, J. C., (2007). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 3rd ed., Informa Healthcare USA, 2315-2338.
- Tavakol, M., Vashegani-Farahani, E. and Hashemi-Najafabadi, S., 2013. The Effect of Polymer and CaCl₂ Concentrations on the Sulfasalazine Release from Alginate-N,O-carboxymethyl Chitosan Beads. *Progress in Biomaterials*, 2: 10.
- Umer, H., Hemlata Nigam, Asif M Tamboli, M. Sundara Moorthi Nainar. (2011). Microencapsulation: Process, Techniques and Applications. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2229-3701.
- USP Guideline for Submitting Requests for Revision to *USP-NF V3.1*, (2007), United State Pharmacopoeia, 1-5.
- Yang, JS., Xie, YJ., He, W., (2011), Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers*, 84 (1): 33-39.
- Yeo, Y., Baek, N. and Park, K., (2001). Microencapsulation Methods for Delivery of Protein Drugs. *Biotechnology Bioprocessing Engineering*, 6: 213-230.

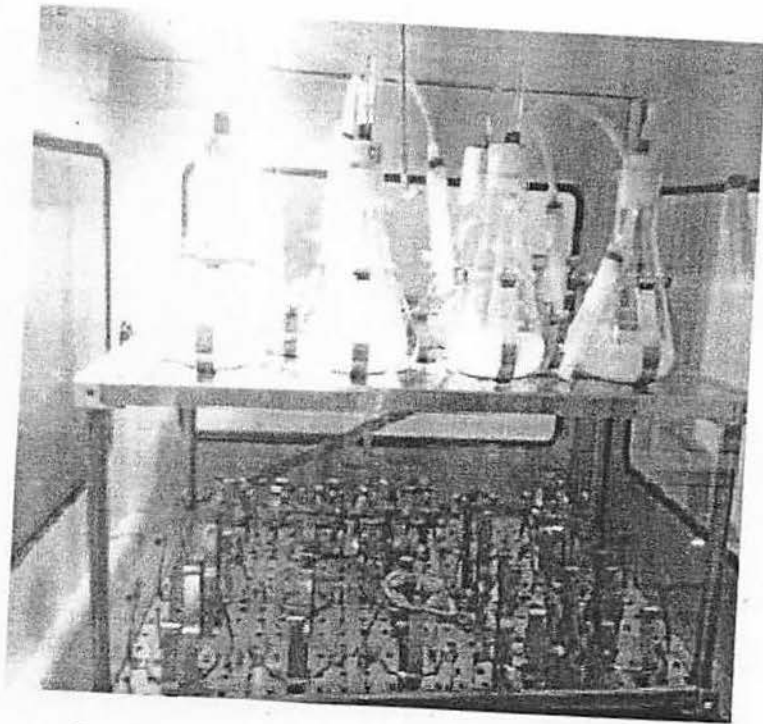
LAMPIRAN

Lampiran I. Instrumen

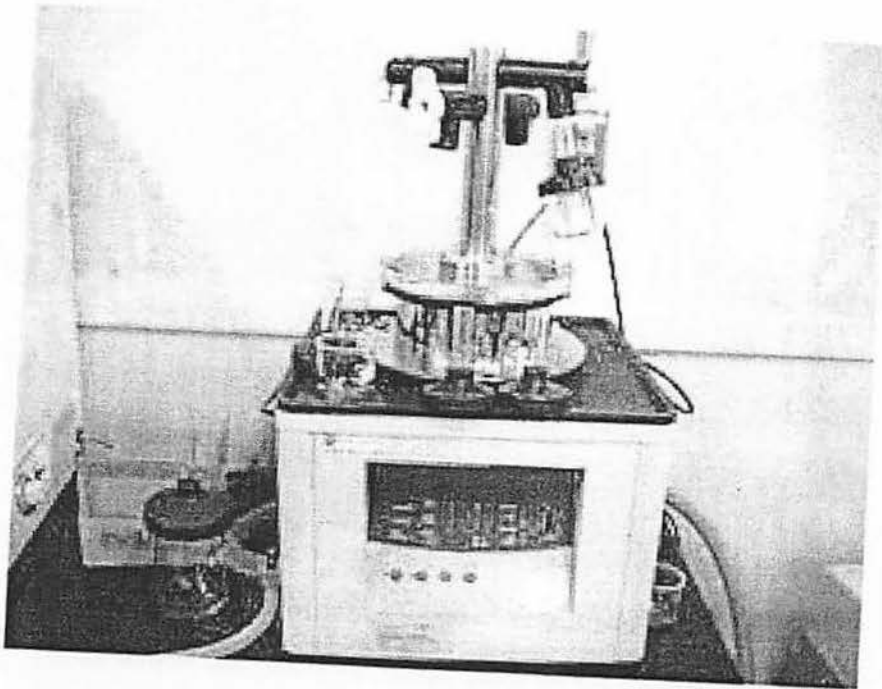


Gambar 5.9. Proses pembuatan mikrofer ovalbumin-alginat

- A. Larutan ovalbumin-alginat
- B. Larutan CaCl_2
- C. Pembuatan mikrofer dengan metode *ionotropic gelation* teknik aerosolisasi
- D. Proses sambung silang mikrofer ovalbumin-alginat.
- E. Mikrofer basah setelah disentrifugasi
- F. Mikrofer kering setelah proses *freeze drying*



Gambar 5.10. Thermoshaker untuk uji pelepasan



Gambar 5.11. Freeze Dryer Eyela untuk pengeringan mikrosfer

Lampiran 2. Personalia tenaga ahli beserta kualifikasinya

1. Ketua Tim Peneliti

Nama Lengkap : Dewi Melani Hariyadi, SSi.,MPhil, Ph.D.Apt.
 Jenis Kelamin : P
 NIP : 19780226 200212 2001
 Disiplin Ilmu : Farmasetika
 Pangkat/Gol : Penata/Gol IIIc
 Jabatan Fungsional/Struktural:Lektor/ Sekretaris Departemen Farmasetika
 Fakultas/Jurusan : Farmasi
 Waktu Penelitian. : 16 jam/minggu
 Tugas : Koordinasi penelitian, formulasi, analisis data dan penanggungjawab laporan penelitian.

2. Anggota Peneliti I

Nama Lengkap : Dra. Esti Hendradi, Apt., MSi., Ph.D
 Jenis Kelamin : P
 NIP : 195711141987032001
 Disiplin Ilmu : Farmasetika
 Pangkat/Gol : Pembina/Gol IVa
 Jabatan Fungsional/Struktural:Lektor Kepala/Ketua Departemen Farmasetika
 Fakultas/Jurusan : Farmasi
 Waktu Penelitian : 10 jam/minggu
 Tugas : Formulasi, evaluasi fisik model vaksin antigen dalam alginate mikrosfer.

3. Anggota Peneliti II

Nama Lengkap : Dra.Tutiek Purwanti, MSi, Apt.
 Jenis Kelamin : P
 NIP : 19571002 198601 2001
 Disiplin Ilmu : Farmasetika
 Pangkat/Gol : Penata/Gol IIIc
 Jabatan Fungsional/Struktural:Lektor/-

Fakultas/Jurusan : Farmasi
Waktu Penelitian : 10 jam/minggu
Tugas : Formulasi dan evaluasi uji pelepasan bahan aktif dari alginat mikrosfer.

Publikasi

1. Prosiding pada International Conference of Nanotechnology di Universitas pancasila Jakarta, 26 Oktober 2013 dengan judul "CHARACTERIZATION OF OVALBUMIN-ALGINATE MICROSPHERES FROM DIFFERENT CONCENTRATION OF CaCl₂ AND ALGINATE PRODUCED BY AEROSOLIZATION TECHNIQUE"



FIRST INTERNATIONAL CONFERENCE ON PHARMACEUTICAL
NANOTECHNOLOGY/NANOMEDICINE 2013
FACULTY OF PHARMACY PANCASILA UNIVERSITY
INDONESIA

LETTER OF ACCEPTANCE

Dear Ms. Dewi Melani Haryadi

The committee of First International Conference on Pharmaceutical Nanotechnology/ Nanomedicine 2013 would like to thank you for your interest in participating in the conference.

Your presentation entitled 'Characterization of Ovalbumin-Alginate Microspheres from Different Concentration of CaCl₂ and Alginate Produced by Aerosolization Technique' has been reviewed and accepted by the scientific committee of the ICPNN 2013.

We also invite you to submit your full paper for the conference proceeding. Please send your full paper by October 25, 2013 at the latest, directly by email to nanopharmafup@gmail.com with annotation 'FULL PAPER' as a subject. Please note as well that your full manuscript should abide by the guidelines set by the scientific committee.

The conference will be held at Aula Faculty of Pharmacy Pancasila University, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan, Indonesia.

We are looking forward to seeing you in Jakarta, Indonesia
Thank you.

Yours sincerely,

Dr. rer. nat. Deni Rahmat, M.Si., Apt.
The Chairman of First International Conference on Pharmaceutical Nanotechnology/
Nanomedicine 2013



CHARACTERIZATION OF OVALBUMIN-ALGINATE MICROSPHERES FROM DIFFERENT CONCENTRATION OF CaCl₂ AND ALGINATE PRODUCED BY AEROSOLIZATION TECHNIQUE

Dewi Melani Hariyadi^{1*}, Esti Hendradi¹, Octavia Librayanti Vierdina P¹, Lailil Muharromah¹

¹Pharmaceutics Department, Faculty of Pharmacy, Airlangga University
*Corresponding author: dewiffu@ yahoo.com

Background

Ovalbumin is a model of antigen that stimulate the formation of antibodies can be used to improve immunity. Aerosolisation technique was used because it is a simple, fast, cost effective and no organic solvent is needed which can contribute to protein integrity (Yeo *et al.*, 2001). Sodium alginate is most commonly used as polymer in the microparticles (Maria *et al.*, 2012). Ca²⁺ ions have been extensively used as crosslinking agents due to low toxicity and ability to form a good gel and provided significant stability (Putra *et al.*, 2011). Several factors contributed to microparticles preparation such as concentration of polymer and crosslinking agents (Jin *et al.*, 2009). Therefore, this research were performed to study the potential of ovalbumin-alginate microspheres using different concentration of alginate polymer and CaCl₂ crosslinker.

Alginate microsphere preparation

Alginate solution containing ovalbumin was sprayed into crosslinking agent CaCl₂ solution and was stirred continuously for 2 hours at 1000 rpm. The microspheres were collected by centrifugation at 2500 rpm for 6 minutes, washed two times with aquadest and finally freeze dried 20 hours at -80°C.

Characterization of Microspheres

The morphology of microspheres were characterized by optical microscopy completed with camera and scanning electron microscopy (SEM). The encapsulation efficiency, protein loading and yield were also determined.

Results and Discussion

TABLE 2. Encapsulation Efficiency, Loading and Yield of Microspheres

Formula	Appearance	Encapsulation Efficiency (EE) (%)	Protein Loading (%)	Yield (%)
A1	Gelling sheet			
A2	Microspheres	38.31 ± 10.38	20.60 ± 5.78	33.56 ± 2.62
A3	Microspheres	63.775 ± 4.33	64.22 ± 18.82	62.30 ± 13.90
B1	Microspheres	59.96 ± 28.92	44.07 ± 13.17	50.43 ± 15.79
B2	Microspheres	67.18 ± 18.03	64.10 ± 9.93	51.84 ± 6.29
B3	Microspheres	88.80 ± 0.52	74.50 ± 1.70	69.53 ± 5.01

TABLE 1. Ovalbumin-alginate microspheres formulation

CaCl ₂ Concentration (M)	Alginate concentration (%)	
	1.5	2.5
0.1	A1	B1
0.5	A2	B2
1.5	A3	B3

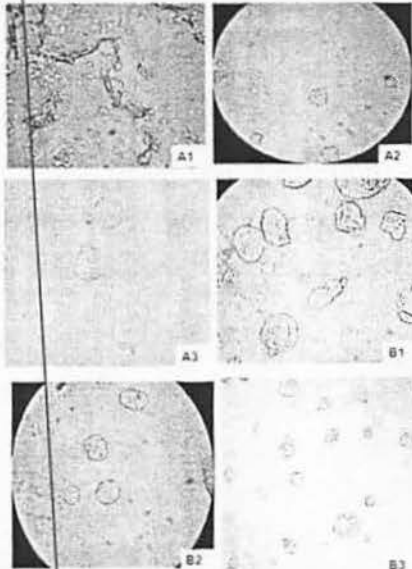


Figure 1. Morphological investigation of ovalbumin-alginate microspheres using light microscopy



Figure 2. Particle size of ovalbumin – alginate microspheres from all formulas

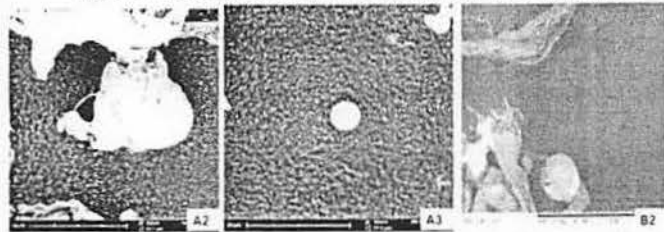


Figure 3. SEM Morphological investigation of ovalbumin-alginate microspheres

Conclusion

High entrapment efficiency, high protein loading, microspheres yield and small particle size of ovalbumin-alginate microsphere was successfully produced using this ionotropic gelation-aerosolization method which can be utilized as one of oral protein or vaccine delivery systems.

REFERENCES

1. Jin, M., Yeung Zhang, (Joonkyung He, 2009) Preparation and characterization of bovine serum albumin alginate-chitosan microspheres for oral administration. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* p. 245-250
2. Maria, M. S., Schier, Herbert, Junji, Tera, 2012. Microencapsulation of bovine serum in cross-linked alginate matrix. *Journal of Microencapsulation* p. 286-295.
3. Mawardi, F. M., Kusni, F. M., Pratiwi, B., Wastukirni, 2010. Calcium alginate cross-linked polymer microcapsules for oral sustained drug delivery in rabbits. *Drug Discovery & Therapeutics* p. 109-122
4. Putra, Joban, A.H., Bhushan Ashok Kerkar, Sudhar Bhaskar Chakravar, 2011. Calcium alginate as supporting matrix for the immobilization of ribonuclease from *Chryseobacterium* species. *Research Article Biotechnology Bio-Innovation Engineering* p. 529-535.
5. Yeo, Yoon, Suk N., Park, Kyoung, 2001. Microemulsion Methods for Delivery of Protein Drugs. *Research Article (Biotechnology Bio-Innovation Engineering)* p. 213-230.

The 1st International Conference on Pharmaceutical Nanotechnology/Nanomedicine 2013, Faculty of Pharmacy Pancasila University, Jakarta, Indonesia, October 26, 2013

2. Submitted to Drug Delivery (International Journal with Impact Factor 2.1), "EFFECT OF CROSS LINKING AGENT AND POLYMER ON THE CHARACTERISTICS OF OVALBUMIN-LOADED ALGINATE MICROSPHERES". November 2013.

Subject: Drug Delivery - Manuscript DDDO-2013-0308

From: v.torchini@neu.edu (v.torchini@neu.edu)

To: dewi.melani@yahoo.com; dewi.melani@unair.ac.id

Date: Thursday, 7 November 2013 9:36 AM

06 Nov 2013

Dear Dr Haniyati:

Your manuscript entitled "EFFECT OF CROSS LINKING AGENT AND POLYMER ON THE CHARACTERISTICS OF OVALBUMIN LOADED ALGINATE MICROSPHERES" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Drug Delivery.

Your manuscript ID is UDDO-2013-0308

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/iddo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/iddo>

Thank you for submitting your manuscript to Drug Delivery

Sincerely,
Drug Delivery Editorial Office

Visit <http://www.informapharmaceutical.com> and sign up for free eTOC alerts to all Informa Pharmaceutical Science journals

