

Kode>Nama Rumpun Ilmu* : 405 / Farmasetika-Teknologi Farmasi
Bidang Fokus : Kesehatan dan Obat

LAPORAN AKHIR TAHUN 2018
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)



OPTIMASI TEKNIK SPRAY DALAM PROSES MIKROENKAPSULASI
Lactobacillus casei FNCC MATRIKS KOMBINASI
KOPOLIMER ASAM METAKRILAT TIPE L DAN TIPE S

TAHUN KE 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. Sugiyartono, MS. Apt.; NIDN : 0004105403
Prof. Dr. Widji Socratri, DEA.Apt. ; NIDN : 0006105103
Dr.Dewi Isadiartuti , MSi.,Apt.: 0020056569

DIBIYAI OLEH
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

NOMOR : 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOPEMBER 2018

Kode>Nama Rumpun Ilmu* : 405 / Farmasetika-Teknologi Farmasi
Bidang Fokus : Kesehatan dan Obat

LAPORAN AKHIR TAHUN 2018
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

KKB
10K-2
LP-118/19
Sug
0

OPTIMASI TEKNIK SPRAY DALAM PROSES MIKROENKAPSULASI
Lactobacillus casei FNCC MATRIKS KOMBINASI
KOPOLIMER ASAM METAKRILAT TIPE L DAN TIPE S

TAHUN KE 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. Sugiyartono, MS. Apt.; NIDN : 0004105403
Prof. Dr. Widji Soeratri, DEA.Apt. ; NIDN : 0006105103
Dr.Dewi Isadiartuti , MSi.,Apt.: 0020056509

DIBIYAI OLEH
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

NOMOR : 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOPEMBER 2018

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : OPTIMASI TEKNIK SPRAY DRYING DALAM PROSES MIKROENKAPSULASI *Lactobacillus casei* FNCC MATRIKS KOMBINASI KOPOLIMER ASAM METAKRILAT TIPE L DAN TIPE S

Peneliti/Pelaksana
 Nama Lengkap : Dr. Drs SUGIYARTONO, Apt, M.S
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 NIDN : 0004105403
 Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 Program Studi : Pendidikan Profesi Apoteker
 Nomor HP : 08155125474
 Alamat surel (e-mail) : soegiyartono@ff.unair.ac.id

Anggota (1)
 Nama Lengkap : Dra WIDJI SOERATRI
 NIDN : 0006105103
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
 Nama Lengkap : Dr. Dra DEWI ISADIARTUTI Apt, M.Si
 NIDN : 0020056509
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
 Nama Institusi Mitra : -
 Alamat : -
 Penanggung Jawab : -
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 75,000,000
 Biaya Keseluruhan : Rp 200,000,000



Mengetahui,
 Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
 (Dr. Umi Athijah, MS., Apt.)
 NIP/NIK 195604071981032001

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018

Ketua,

(Dr. Drs SUGIYARTONO, Apt, M.S)
 NIP/NIK 195410041981031003

Menyetujui,
 Ketua LPI Universitas Airlangga

 (Prof. Dr. Hery Purnobasuki, Drs., MSi. PhD)
 NIP/NIK 196750711991021001



RINGKASAN

Lactobacillus casei merupakan bakteri probiotik yang dapat memberikan efek positif pada kesehatan orang yang mengonsumsi probiotik. Efek pada kesehatan tersebut akan terjadi apabila jumlah bakteri yang sampai ke target organ mencapai 10^6 Cfu/ml . Karena bakteri probiotik ini tidak tahan dalam suasana asam dan mempunyai target kerja di intestin, maka *Lactobacillus casei* membutuhkan sistem penghantaran obat yang dapat melindungi selama di lambung dan melepaskan ketika sampai di intestin.

Salah satu sistem penghantaran bahan aktif yang sesuai untuk bakteri probiotik adalah mikropartikel dengan matruiks kopolimer asam metakrilat tipe L oleh karena kopolimer ini tidak larut dalam suasana asam dan larut dalam suasana basa (pH >6). Agar mikropartikel yang dihasilkan mempunyai kualitas yang maksimal, maka dalam formula mikropartikel dapat di tambah dengan bahan lain yang membantu proses pengeringan, yakni plasticizer misalnya dietilftalat.

Dalam penelitian ini *Lactobacillus casei* disuspensikan dalam dispersi kopolimer asam metakrilat. Pada penelitian Tahun I, dilakukan optimasi kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan Tipe S. Pada tahun ke dua dilakukan optimasi teknik spray drying, meliputi suhu inlet dan laju alir.

Mikropartikel yang dihasilkan diuji karakteristik fisiknya yang meliputi : morfologi bentuk, morfologi permukaan, ukuran partikel, kandungan lengas, viabilitas bakteri, efisiensi pengebakan dan pelepasan bakteri. Data yang didapat dianalisa dengan uji statistik manova pada $\alpha=0.05$



PRAKATA

Dengan mengucap puji syukur ke hadirat Allah Swt. Penelitian kami yang berjudul **Optimasi Teknik Spray Drying Dalam Mikroenkapsulasi Lactobacillus casei FNCC Matriks Kombinasi Kopolimer Asam Metakrilat Tipe L dan Tipe S** telah berhasil kami selesaikan.

Selanjutnya dengan segala kerendahan hati perkenankan saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi tingginya kepada yang terhormat :

1. **Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Nasih, SE., MT, Ak.**
2. **Ketua LPI, Prof. Dr. Hery Purnobasuki**
3. **Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Dr. Umi Athiyah, MS.,Apt.**

Atas kesempatan dan bantuan dana sehingga penelitian dapat kami selesaikan dengan sebaik baiknya.

Terima kasih juga kami sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu hingga terlaksananya penelitian ini dengan lancar.

Surabaya, 12 Nopember 2018

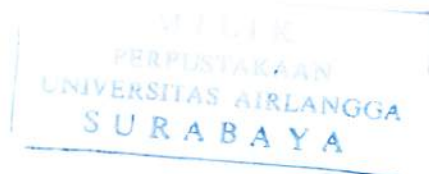
Sugiyartono

DAFTAR ISI

Halaman Sampul	i
Halaman Pengesahan	ii
Ringkasan	iii
Prakata	iv
Daftar Isi	iv
Bab 1. PENDAHULUAN	1
Bab 2 Tinjauan Pustaka	4
Bab 3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	8
Bab 4. Metode Penelitian	9
Bab 5. Hasil dan Luaran Yang Dicapai	25
Bab 6. Rencana Tahapan Berikutnya.....	26
Bab 7. Kesimpulan dan Saran.....	30
Daftar Pustaka	31

Lampiran:

- Artikel Ilmiah



DAFTAR TABEL

Tabel 5.1. Hasil karakterisasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S.....	25
Tabel 5.2. Hasil pengukuran pH, Bilangan asam, viskositas	26
Tabel 5.3. Penetapan kurva korelasi biomasa-transmitan	28
Tabel 5.4. Hasil pengukuran pH, Bilangan Asam, Viskositas.....	29
Tabel 5.6. Hasil pengukuran diameter partikel, MC, dan morfologi.....	30
Tabel 5.7. Hasil uji vibilitas dan ketahanan erhadap asam serta efisiensi enkapsulasi mikropartikel	33
Tabel 5.8. Hasil ketahanan terhadap suhu dan asam	34
Tabel 5.9. Hasil uji pelepasan <i>Lactobacillus</i> sp. dari mikropartikel	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 5.1. Hasil uji optimasi pertumbuhan bakteri.....	27
Gambar 5.2. Fotograf mikropartikel (SEM)	31
Gambar 5.3. Termogram DTA dari kopolimer asam metakrilat tipe L dan S....	32
Gambar 5.4. Difraktogram sinar X dari kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S	32
Gambar 5.5. Spektrogram kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S.....	32

Bab 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Mikropartikel adalah partikel dengan ukuran mikron (1-1000 μm) yang dibuat dengan metode mikroenkapsulasi (Vogelson CT., 2001; Benita, 2005; Umer H., 2011). Bahan aktif yang dapat dijadikan mikropartikel, diantaranya adalah probiotik *Lactobacillus casei*. Untuk dapat memberikan efek pada kesehatan, maka probiotik harus mampu bertahan pada jumlah $10^6 - 10^7$ cfu/g di target aksinya (FAO/WHO, 2001). Viabilitas probiotik dipengaruhi oleh beberapa hal, diantaranya adalah : oksigen, suhu tinggi, enzim pencernaan, dan pH rendah misalnya pH lambung. Kematian 90% bakteri *Lactobacillus casei* akibat terpapar pada pH lambung telah diteliti oleh Kailasapathy et al (2000), Krasaekpoot et al., (2003) dan Corcoran et al., (2005).

Metode mikroenkapsulasi dapat dilakukan dengan berbagai cara, diantaranya adalah : inclusion complexation-coacervation, hot-melt, solven evaporation cross linking, interfacial polymerization, freeze drying dan spray drying. Spray drying atau pengeringan sembur memiliki keuntungan yaitu : proses cepat, menghasilkan mikroartikel dengan kandungan lembab yang rendah dibandingkan dengan freeze drying, dan ukuran partikel yang kecil , antara 10 -600 mikron. Spray drying juga dapat dilakukan secara rutin, variasi hasil rendah, ekonomis dan dapat digunakan dengan skala besar (Desmind et.al., 2002; Zuidam and Shimoni, 2010).

Parameter teknik spray drying yang dapat mempengaruhi kualitas mikropartikel meliputi : suhu inlet, laju alir larutan matriks, tekanan penyemprotan, (Zuidam and Shimni, 2010). Parameter ini dapat mempengaruhi waktu penguapan dan pemadatan matriks sehingga dapat mempengaruhi kualitas mikropartikel.

Kualitas mikropartikel meliputi karakteristik fisik, kapasitas, dan efektivitas. – pelepasan. Mikropartikel probiotik harus dapat melepaskan bahan aktif dalam dua fase, yaitu

fase tunda (lag phase) dan fase pelepasan (release phase). Pelepasan seperti ini dikenal dengan pelepasan pulsatile (Bussemer, 2006). Matriks yang sesuai untuk bakteri probiotik harus menggunakan polimer yang mampu melindungi bakteri dari kondisi asam di lambung dan melepaskannya di instestinal. Contoh polimer yang dapat digunakan diantaranya adalah kopolimer asam metakrilat tipe L (Sonje dan Chandra, 2013). Kombinasi matriks kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S merupakan kombinasi yang sering digunakan sebagai matriks pulsatile.

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk optimasi teknik spray drying dengan berdasar pada parameter suhu inlet (100 °C, 120 °C dan 140 °C) serta laju alir : 1 ml/ menit, 5 ml/menit dan 10 ml/menit.

1.2.Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah pengaruh suhu inlet 100 °C, 120 °C dan 140 °C terhadap karakteristik fisik mikropartikel *Lactobacillus casei* dengan matriks kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S.
2. Bagaimanakah pengaruh laju alir : 1 ml/ menit, 5 ml/menit dan 10 ml/menit. terhadap karakteristik fisik mikropartikel *Lactobacillus casei* dengan matriks kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S.
3. Dari parameter teknik spray drying yang meliputi suhu inlet dan laju alir, mana yang menghasilkan mikropartikel dengan kualitas yang optimal,



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

3.1. Sistem Penghantaran Obat (SPO)

Sistem penghantaran obat adalah formulasi yang dapat menghantarkan bahan aktif ke dalam tubuh untuk meningkatkan efikasi dan keamanannya dengan cara mengontrol kecepatan, waktu, dan tempat pelepasan obat di dalam tubuh (Jain, 2008).

Sistem penghantaran obat dapat dibagi berdasarkan mekanisme pelepasan obatnya yaitu *immediate release* dan *modified release* (Perrie dan Rades, 2010).

A. *Immediate release*

Immediate release yaitu obat segera dilepaskan setelah diminum. Sistem pelepasan ini diperlukan untuk obat yang diinginkan segera memberikan efek terapi. Sistem pelepasannya mengikuti kinetika orde pertama, artinya obat segera dilepaskan dan menembus membran kemudian mencapai kadar yang tinggi di dalam plasma dalam waktu yang singkat.

B. *Modified release*

Modified release dapat diklasifikasikan menjadi *delayed release*, *extended release*, *pulsatile release* dan *targeted release*.

Pulsatile release

Pulsatile release merupakan pelepasan cepat bahan aktif setelah melewati *lag phase*. Keuntungan *pulsatile release* yaitu dapat melindungi bahan aktif dari degradasi oleh saluran gastrointestinal, mengurangi efek samping, dan dapat digunakan untuk penghantaran tertarget. Ada beberapa stimulus yang dapat menginduksi pelepasan obat salah satunya adalah pH. Pelepasan bahan aktif yang distimulus oleh pH dapat dicapai dengan penggunaan polimer yang peka terhadap perubahan pH (Singh *et al.*, 2012).
Mikropartikel

Mikropartikel adalah salah satu sistem penghantaran obat yang memiliki ukuran 1 μm – 1000 μm (Kumari *et al.*, 2016). Morfologi mikropartikel yang baik yaitu sferis, halus dan tidak porus (Jiang *et al.*, 2002). Mikroenkapsulasi adalah proses penjebakan bahan padat, cair, atau gas dalam suatu matriks polimer yang sesuai. Tujuan dari mikropartikel yaitu untuk melindungi bahan aktif dari lingkungan, menstabilkan bahan aktif yang sensitif, mengurangi inkompatibilitas, meningkatkan bioavailabilitas, mengurangi efek samping, atau menutupi rasa yang tidak enak (Kumar *et al.*, 2011).

Mikrokapsul merupakan sistem dimana bahan aktif dijebak di sekeliling polimer. Bahan obat dapat berupa padatan, cairan, atau gas. Mikrokapsul dibagi menjadi tiga kategori yaitu *monocored*, *polycored*, dan mikrokapsul tipe matriks. Mikrokapsul

monocored hanya memiliki satu lapis polimer yang mengelilingi bahan aktif. Mikrokapsul polycored yaitu bahan aktif dikelilingi oleh beberapa lapis polimer yang berbeda ukuran. Mikropartikel tipe matriks memiliki bahan aktif yang terintegrasi dalam lapisan matriks (Kumar *et al.*, 2011).

Mikrosfer merupakan sistem dimana bahan aktif terdisolusi atau terdispersi homogen dalam matriks polimer. Mikrosfer memiliki pelepasan yang berbeda dengan mikrokapsul

Metode yang digunakan untuk enkapsulasi bahan aktif dalam polimer harus memenuhi syarat berikut yaitu stabilitas dan aktivitas bahan aktif tidak berkurang setelah proses, memiliki efisiensi penjebakan yang sesuai dengan yang diharapkan, kualitas mikropartikel dan profil pelepasan bahan obat reproduibel. Pemilihan metode pembuatan mikropartikel juga tergantung pada bahan yang digunakan dan kelarutan bahan aktif yang akan dijebak. Salah satu metode yang banyak digunakan karena memiliki banyak keuntungan adalah metode *spray drying* (Kumar *et al.*, 2011).

Spray drying

Spray drying merupakan metode yang paling sering digunakan untuk proses mikroenkapsulasi di industri makanan. Hal ini dikarenakan metode *spray drying* fleksibel dan ekonomis. Energi yang digunakan untuk proses mikroenkapsulasi dengan *spray drying* 6 sampai 10 kali lebih rendah dibandingkan menggunakan *freeze drying* dan menghasilkan mikropartikel yang berkualitas baik. Selain itu *spray drying* disukai karena prosesnya cepat dan menghasilkan reproduibilitas yang tinggi (Martin *et al.*, 2014).

Spray drying dipengaruhi oleh beberapa hal, diantaranya adalah (Patel, 2009; Mishra, 2011)

a. Konsentrasi larutan/suspensi *dry*.

b. Proses Atomisasi

Pada tahap ini akan menghasilkan kondisi optimal untuk penguapan sehingga menjadi produk kering yang memiliki karakteristik sesuai yang diinginkan.

c. Kontak droplet-udara

d. Suhu *inlet*

Apabila suhu *inlet* semakin tinggi, penguapan akan menjadi lebih cepat tetapi dapat menyebabkan perubahan sifat kimia fisika pada bahan yang tidak tahan panas. Suhu *inlet* yang tinggi dapat meningkatkan energi yang diperlukan untuk

proses pengeringan dan meningkatkan suhu outlet.

e. Suhu *outlet*

Suhu *outlet* yang terlalu rendah dapat menyebabkan mikropartikel yang terbentuk menempel satu dengan yang lain sehingga proses pengeringan menjadi tidak sempurna. Suhu *inlet* mempengaruhi suhu *outlet*. Ketika suhu *inlet* meningkat, suhu *outlet* juga meningkat. Suhu *outlet* dapat mempengaruhi viabilitas bakteri.

f. Viskositas

Viskositas yang tinggi dapat menghambat pembentukan droplet. Viskositas yang rendah dapat mengurangi energi dan tekanan yang dibutuhkan untuk pembentukan partikel .

g. Komposisi bahan padat

Apabila kandungan bahan padat lebih dari 30%, diperlukan perhatian lebih selama proses atomisasi agar menghasilkan droplet yang lebih baik.

h. Tegangan permukaan

Penambahan surfaktan dalam jumlah sedikit dapat menurunkan tegangan permukaan secara signifikan. Sehingga dapat menghasilkan pola penyemprotan lebih luas, ukuran droplet lebih kecil, dan laju pembentukan droplet semakin cepat.

i. Suhu bahan yang akan masuk (*feed*)

Apabila suhu larutan yang akan disemprotkan lebih tinggi, proses pengeringan akan lebih cepat karena membawa energi yang lebih besar ke dalam sistem.

j. Volatilitas pelarut

Pelarut yang memiliki volatilitas tinggi dapat mempercepat proses pengeringan. Contoh pelarut yang dapat digunakan yaitu air.

3.2. Matriks Mikropartikel

Pemilihan matriks yang digunakan untuk formulasi mikropartikel merupakan sesuatu yang harus diperhatikan karena memiliki pengaruh terhadap kualitas mikropartikel yang dihasilkan. Hal yang perlu diperhatikan saat memilih matriks untuk mikropartikel yaitu sifat fisikokimia (komposisi kimia, morfologi, kekuatan mekanik, stabilitas di lambung dan cairan intestinal), toksisitas, proses pembuatan dan sterilisasi. Beberapa matriks yang dapat digunakan untuk pembuatan mikropartikel probiotik yaitu alginat, gelatin, karagenan, chitosan, selulosa, asam metakrilat (Almeida *et al.*, 2012; Gbassi dan

Vandamme, 2012)

Kopolimer Asam Metakrilat

Kopolimer asam metakrilat terdiri dari asam metakrilat dan akrilat atau ester metakrilat. Kopolimer asam metakrilat banyak digunakan untuk melindungi obat yang memiliki target aksi di intestinal (Augsburger , 2008). Beberapa jenis kopolimer asam metakrilat yang dapat digunakan untuk pelepasan bahan aktif di intestinal yaitu kopolimer asam metakrilat tipe S dan kopolimer asam metakrilat tipe L (Sonje *et al.*, 2013).

Kopolimer Asam Metakrilat Tipe L

Kopolimer asam metakrilat tipe L merupakan kopolimer anionik yang tersusun atas asam metakrilat dan metil metakrilat (1:1) serta memiliki viskositas 60 – 120 mPa.s. Kelarutan kopolimer asam metakrilat tipe L dipengaruhi oleh pH. Kopolimer asam metakrilat tipe L akan melepaskan bahan aktif pada pH 6 – 6,5, contohnya pada intestinal. Kopolimer asam metakrilat tipe L memiliki karakteristik fisik yaitu serbuk putih dan memiliki sedikit bau yang khas. Kopolimer asam metakrilat tipe L memiliki suhu transisi gelas lebih dari 130 °C (± 5 °C) dan suhu minimal pembentukan lapisan film sebesar 85 °C (Augsburger , 2008; Kumar *et al.*, 2014).

Lapisan film terbentuk karena adanya koalesensi antar partikel. Pembentukan lapisan film diawali dengan menguapnya air yang ada di dalam dispersi polimer sehingga partikel-partikel menjadi berdekatan dan berinteraksi satu dengan yang lain. Selanjutnya partikel tersebut mengalami deformasi dan bergabung membentuk lapisan film. Suhu dan laju penguapan air merupakan faktor yang mempengaruhi sifat matriks yang dihasilkan (Gaur *et al.*, 2014). Ilustrasi mekanisme pembentukan lapisan film ditunjukkan pada gambar 2.12. Untuk menjamin kondisi optimal pembentukan lapisan film, suhu yang digunakan sebaiknya 10 – 20 °C di atas suhu minimal pembentukan film. Penambahan *plasticizer* ke dalam formula pembentuk matriks dapat menurunkan suhu transisi gelas polimer sehingga suhu yang dibutuhkan untuk membentuk lapisan film menjadi lebih rendah (Zhu *et al.*, 2002).

Salah satu karakteristik fisik mikropartikel yang penting adalah pelepasan bahan aktif, karena menyangkut kemanfaatan bahan aktif tersebut. (Jiang *et al.*, 2002; Rathore *et al.*, 2013). Mikropartikel juga harus dapat melindungi bahan aktif dari lingkungan luar yang bisa menyebabkan viabilitas bakteri menurun, contohnya suhu tinggi saat proses mikroenkapsulasi dan pH asam lambung. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei

Lactobacillus termasuk dalam kelompok bakteri asam laktat. *Lactobacillus* merupakan bakteri gram positif, bentuk kokus, tidak berspora, fakultatif anaerob, toleran terhadap suasana asam (Pithva *et al.*, 2012; Mesquita, *et al.*, 2017). *Lactobacillus* dapat mengubah laktosa menjadi asam laktat. Ketika menghasilkan asam laktat maka akan timbul suasana yang tidak menguntungkan bagi bakteri berbahaya sehingga memaksa bakteri tersebut untuk keluar dari tubuh (Islam *et al.*, 2010). *Lactobacillus* dapat mencegah dan megobati infeksi yang disebabkan oleh bakteri karena *Lactobacillus* memiliki kemampuan untuk memodulasi respon imun *host* dan dapat melindungi *host* dari pathogen. Bakteri ini dapat tumbuh optimal pada pH antara 4,5 – 8,5 (Huq *et al.*, 2013). *Lactobacillus* tahan terhadap beberapa antibiotika, misalnya ciprofloxacin, gentamycin, dan streptomycin. Selain itu bakteri ini juga relatif taha terhadap suasana asam, yaitu pada pH 3,4 – 4,4, (Hummel, 2007)

Bab 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN



3.1. Tujuan Penelitian

3.1.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah melakukan optimasi teknik spray drying dalam pembuatan mikropartikel bakteri probiotik *Lactobacillus casei*

3.1.2. Tujuan Khusus

1. Memperoleh data pengaruh suhu inlet 100 °C, 120 °C dan 140 °C terhadap karakteristik fisik mikropartikel *Lactobacillus casei* dengan matriks kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S.
2. Memperoleh data pengaruh laju alir : 1 ml/ menit, 5 ml/menit dan 10 ml/menit. terhadap karakteristik fisik mikropartikel *Lactobacillus casei* dengan matriks kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S.
3. Memperoleh data parameter teknik spray drying yang meliputi suhu inlet dan laju alir, yang menghasilkan mikropartikel dengan kualitas yang optimal,

3.2. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk pengembangan bentuk sediaan mikropartikel dengan mekanisme pelepasan pulsatile dengan bahan aktif mikroorganisme yang digunakan per oral serta memenuhi persyaratan aman, efektif, dan berkualitas.



Bab 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan di laboratorium dengan tahapan sebagai berikut.

Tahap 1 : Identifikasi Bahan Penelitian

Pada tahap ini dilakukan pengujian untuk memastikan bahan yang digunakan dalam penelitian sesuai dengan yang spesifikasi standar.

Identifikasi dilakukan terhadap matriks yaitu kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S

Tahap 2 : Pembuatan mikropartikel

Pada tahap ini dilakukan beberapa langkah kerja yang meliputi :

2.1. Penyiapan inokulum bakteri uji meliputi tahap :

- a. Membuat starter *Lactobacillus Sp.* uji, dengan proses fermentasi bakteri ke dalam media MRS
- b. Optimasi waktu pertumbuhan,
- c. Membuat kurva korelasi transmittan-biomasa
- d. Penyiapan *Lactobacillus Sp.*
- e. Karakterisasi inokulum *Lactobacillus Sp.* : biomasa, Angka Lempeng Total (ALT), dan pH.

2.2. Pembuatan larutan kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S dengan perbandingan 10:0; 8:2; 6:4; 5:5; 4:6; 2:8; 0:10. Total kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S yang digunakan adalah 1,0%. Larutan dibuat dengan bantuan NaOH 0,1N. Larutan yang terbentuk diukur : viskositas, pH , bobot jenis, dan bilangan asam. Selanjutnya larutan ditambah media MRS 0,5%. Larutan yang terbentuk disterilkan dengan otoklaf pada suhu 115⁰C

2.3. Membuat larutan penghantaran bahan aktif dengan cara mencampur secara homogen suspensi *L. acidophilus* dengan larutan kopolimer asam metakrilat . Campuran yang didapat diukur : angka lempeng total (ALT) *Lactobacillus sp.* menggunakan media MRS, viskositas dan pH.

2.4. Membuat mikropartikel dengan teknologi *Spray Drying* untuk mengeringkan larutan matriks dan bakteri probiotik menjadi bentuk kering yaitu :mikropartikel *Lactobacillus sp.* dalam kopolimer asam metakrilat dengan nutrisi MRS broth.

Tahap 3: Uji Spesifikasi Mikropartikel

Mikropartikel yang dihasilkan dari proses mikroenkapsulasi dengan teknologi *spray drying* diuji beberapa parameter uji yang meliputi :

3.1. Karakterisasi fisik dan kimia mikropartikel

a. Karakterisasi fisika: ukuran partikel, kadar air, morfologi, analisis thermal dengan differential thermal analysis, analisis keteraturan molekul padat.

b. Karakterisasi kimia: analisis interaksi kimia antara atom H dari gugus –OH dengan atom O dari gugus –C=O

3.2. Uji Kapasitas Penjebakan:

a. Daya proteksi terhadap suhu

b. Efisiensi penjebakan

c. Daya proteksi terhadap asam Lambung.

3.3. Uji Kapasitas Pelepasan:

a. Uji profil pelepasan *pulsatile*

b. Efisiensi pelepasan biomasa *lactobacillus sp.*

c. Efisiensi pelepasan *lactobacillus sp.* viabel

Tahap 4. Analisis data

4.1. Data hasil uji mikropartikel berbagai formula dengan kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S dengan menggunakan Manna

4.2. Penetapan formula optimal dengan analisis *Simplex Lattice Design* dengan variabel karakteristik fisik mikropartikel, kapasitas penjebakan, kapasitas pelepasan, dan efektivitas *Lactobacillus sp.*

4.2. Variabel penelitian

4.2.1. Klasifikasi variabel

Variabel bebas : perbandingan kombinasi asam metakrilat tipe L dan tipe S

Variabel kendali : Kondisi pengeringan (*spray drying*) : Suhu pengeringan (suhu inlet , suhu outlet), aspirasi dijaga 100% dan laju alir udara siklon pada 30m³/jam. Suhu inlet ditetapkan 120 °C, temperatur outlet 50 °C dan laju aliran sampel 50 ml/menit.

Variabel tergantung : Karakteristik fisik mikropartikel , kapasitas penjerapan dan kapasitas pelepasan.

4.3. Bahan Penelitian

Lactobacillus casei acidophilus FNCC 0051 dan *Lactobacillus casei FNCC 0090* (Laboratorium Gizi dan pangan Universitas Gadjah Mada), Kopolimer Asam Metakrilat tipe L dan tipe S (PT Waris, Pharmaceutical grade); Media de Man Ragosa Shorpe (MRS); NaOH (Merck, Pro Analysis) ; Sel Darah Merah Domba (Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga) ; EDTA

4.4. Alat

Otoklaf; Spray Dryer Buchi Tipe B-290.; pH meter SC glas mainz tipe CG 842; *Differential Thermal Analyzer* (DTA) FP 900 *Thermal System Metler Toledo* FP 85, Viskosimeter VT 04; Spektrometer FTIR (Jasco FT-IR/5300); Moisture Analyzer HB43-S Metler Toledo

Scanning Electron Mycroscopy (SEM) FEI Type : Inspect-S50; Potensiometer

4.5. Lokasi Penelitian

Pembuatan mikropartikel dilakukan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan Fakultas Teknik Universitas Surabaya. Karakterisasi mikropartikel dilakukan di Fakultas Metalurgi Institut Teknologi Surabaya dan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

4.6. Metode Kerja

4.6.1. Identifikasi Bahan Penelitian

4.6.1.1. Kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S

Identifikasi kopolimer dilakukan dengan .Spektroskopi FTIR. Sampel sebanyak 0.5-1,5 mg berbentuk serbuk dicampur kristal KBr sebanyak 200 mg dengan perbandingan sampel: KBr dan digerus hingga homogen kemudian dikempa menggunakan alat pencetak pellet KBr sehingga terbentuk pellet transparan. Pellet diletakkan ke dalam *sample holder* Spektra diukur menggunakan spektroskopi FTIR Jasco- dengan panjang gelombang 4000-400 cm^{-1} . Analisis FTIR dilakukan terhadap sampel dengan interpretasi profil spektrum gugus fungsi dan sidik jari pada bilangan gelombang tertentu

4.6.2. Uji sifat kimia – fisika kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S

Uji sifat kimia (pH dan bilangan asam) serta uji sifat fisika (viskositas) dilakukan terhadap larutan kopolimer dalam isopropanol. Timbang 0,5 gram campuran kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S dilarutkan dalam pelarut campuran 60 ml isopropanol dan 40 ml air diaduk pada suhu 50⁰ C selama 30-60 menit.

Selanjutnya dilakukan pengukuran pH, Bilangan Asam dan viskositas

4.6.2.1.. Uji bilangan asam dari larutan Kopolimer Asam Metakrilat tipe L dan tipe S

Uji dilakukan dengan metode pH metri. pH metri adalah metode titrasi dengan mengamati perubahan pH dan titik ekivalen titrasi ditentukan oleh titik dimana terjadi loncatan potensial yang besar. Volume titik ekivalen dihitung berdasarkan kurva turunan kedua.. Larutan kopolimer dalam isopropanol dititrasi dengan larutan NaOH 0,5 N.

1 ml larutan 0.5N NaOH setara dengan 43.045 mg unit asam metakrilat.

Bilangan asam = mg KOH yang diperlukan untuk menetralkan gugus asam dari 1 gram bahan kering

$$\text{Bilangan asam} = \text{Unit asam metakrilat} \times 6.517$$

4.6.2.2. Uji pH larutan kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S

Larutan kopolimer dalam isopropanol-air (6:4) ditentukan pH nya dengan alat pH meter SCHOTT glass mainz tipe CG 842 yang telah dikalibrasi menggunakan larutan dapar standar.

4.6.2.3. Uji Viskositas larutan Kopolimer Asam Metakrilat tipe L dan tipe S

Larutan kopolimer dalam isopropanol terlebih dahulu ditentukan densitasnya dengan cara sebagai berikut : ditimbang piknometer kosong pada suhu 27,5 °C . Masukkan sampel kedalam piknmeter sampai penuh. Ditimbang pada suhu yang sama. Densitas larutan dihitung dengan rumus :

$$\rho = \frac{(\text{berat piknometer} + \text{isi}) - (\text{berat piknometer kosong})}{\text{Volume}}$$

ρ = densitas larutan (g/ml)

Uji viskositas dilakukan dengan alat viskometer Ostwald.

Sebelum menentukan viskositas terlebih dahulu harus ditentukan densitas larutan dengan menggunakan piknometer. Larutan dimasukkan melalui pipa a sampai ruang r penuh terisi. Larutan dihisap melalui pipa b sampai naik melewati garis m. Hisapan dihentikan dan biarkan larutan dibiarkan turun sampai garis n dicatat waktu yang dibutuhkan larutan untuk mengalir dari garis m ke garis n.

$$\eta = t \times \rho$$

η = viskositas (cp)

ρ = densitas (g/ml)

4.6.3. Preparasi suspensi *lactoacillus sp.*

Pada tahap ini dilakukan beberapa langkah kerja yang meliputi : pembuatan starter bakteri, karakterisasi bakteri, optimasi lama fermentasi dengan cara menentukan kurva pertumbuhan *Lacidophilus sp.* menentukan kurva baku biomasa – transmitan, selanjutnya dilakukan fermentasi media MRS dengan bakteri *lactobacillus sp.*

Preparat bakteri uji ditentukan: viabilitas bakteri *lactobacillus sp.* , viskositas , dan pH

4.6.3.1. Pembuatan Starter Probiotik

Lactobacillus sp. dari kultur persediaan induk diperbanyak dengan cara : dipindahkan satu Ose dimasukkan ke dalam 50 ml media MRS agar dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 48 jam. Starter disimpan pada suhu 4° C.

4.6.3.2. Optimasi Lama Fermentasi

Tahap ini dimaksudkan untuk optimasi lama fermentasi dengan cara menentukan kurva pertumbuhan . Media MRS broth ditambah 1 Ose *lactobacillus sp.* starter dan daduk hingga merata dan didiamkan pada suhu 37° C. Sampel diambil pada jam ke 0, 4, 6, 8, 12, 16, 18, 24 dan 48 jam selama 24 jam. Diambil sampel 1 ml di tambah dengan *phospahte buffer saline* steril dan di *vortex*. Dilakukan dengan larutan PBS dan diambil 1 ml untuk dimasukkan pada plate dan ditambah 10 ml MRS agar steril. Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37° C. Dilakukan pemeriksaan pH dan penentuan angka lempeng total (ALT) pada masing masing sampel.

4.6.3.2.1. Penentuan pH

Penentuan pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter SCHOTT glass mainz tipe CG 842 yang telah dikalibrasi dengan menggunakan larutan dapar standar.

4.6.3.2.2. Penentuan ALT

1 ml sampel uji optimasi waktu pertumbuhan ditambah 9 ml larutan PBS (*phosphate buffer saline*) pH 7,2 steril campur dengan menggunakan *vortex*. Dilakukan pengenceran 10 seri masing-masing 1:10. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan larutan PBS steril. Masing masing oengenceran diambil 1 ml dengan menggunakan pipet dan dimasukkan ke dalam plate, Selanjutnya tambahkan 9 ml MRS agar steril ke dalam plate. Plate digoyang sehingga sapel tercampur homogen. Biarkan agar memadat dan inkubas pada suhu 32° C

selama 48 jam. Perhitungan jumlah bakteri dilakuakn dengan satuan colony forming unti per ml.

$$\text{Log (CFU/ml)} = \log \{(\text{jumlah kolonixfaktor pengenceran})/0,1\}$$

4.6.3.3. Penentuan kurva korelasi antara % Transmittan dengan Biomasa *Lactobacillus sp.*

Dibiakkan 1 ose *lactobacillus sp.* dari starter kedalam media MRS broth steril. Diinkubasi pada suhu 37^o C sesuai waktu optimal pertumbuhan, yaitu 12 jam. Sampel yang diambil berjumlah 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml dan 9 ml. Dari masing-masing sampel disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan bakteri dengan media MRS. Pencucian minimal dilakukan 3 kali menggunakan air suling steril. Masing masing sampel ditambah dengan 4 ml air suling steril, dan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan didekantasi, bakteri yang tertinggal dalam tabung dikeringkan dengan oven 50^o C selama 48 jam. Bakteri kering ditambah air suling steril , dilakukan pengenceran beberapa seri dan masing masing diukur transmitannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.

4.6.3.4. Pembuatan preparat induk bakteri uji *lactobacillus sp.*

Dibiakkan 1 ose *lactobacillus sp.* dari starter dalam 100 ml media MRS broth steril. Inkubasi pada suhu 37^o C selama 12 jam. Setelah 12 jam dipindahkan suspensi bakteri yang terbentuk ke dalam erlenmeyer steril. Bakteri dalam erlenmeyer tersebut ditentukan kandungan biomasa dengan mengukur transmittan pada λ 580 nm dan menghitung ALT dengan metode yang sama dengan metode nomor 4.6.3.2.2.

4.6.4. Pembuatan larutan kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S.

Dispersikan kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan S. Dengan perbandingan : 10:0; 8:2; 6:4; 5:5; 4:6; 2:8; dan 0:8. Dengan cara menambahkan larutan NaOH 0.1 N kedalam 400 ml dispersi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S untuk masing masing formula, menggunakan pengaduk magnetik selama 30 menit, sampai kopolimer larut membentuk larutan jernih. Ditambahkan kedalam larutan kopolimer asam metakrilat tersebut dengan bakteri uji dalam bentuk suspensi. Larutan yang terbentuk ditambah dengan media MRS sebanyak 0,5%.

4.6.5. Pembuatan Mikropartikel

4.6.5.1. Pencampuran bakteri uji (*lactobacillus sp.* dengan larutan kopolimer asam metakrilat - MRS

Larutan kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S - MRS, sesuai formula (Tabel 4.2.). sebanyak 400 ml dicampurkan dengan 100 ml suspensi bakteri uji *Lactobacillus sp.* diaduk selama 1 – 2 menit dengan pengaduk magnetik. Campuran diaduk homogen dan diuji : pH, densitas, viskositas, dan ALT *Lactobacillus*

sp.

4.6.5.2. Proses Mikroenkapsulasi dengan Teknologi *Spray Drying*

Campuran dipanaskan pada suhu 60 °C untuk menyiapkan bakteri sebelum di *spray* pada suhu 120 °C. Setelah tercapai suhu 60 °C, segera dilakukan proses *spray drying* dengan aspirasi dijaga pada 100% dan laju alir udara siklon pada 30m³/jam. Temperatur inlet ditetapkan 120 °C, dan temperatur outlet 50 °C dan laju aliran sampel 50 ml/menit.

Tabel 4.2.
Formula Mikropartikel Probiotik-*Lactobacillus sp.*
Dengan Matriks Kopolimer Asam Metakrilat Tipe L dan Tipe S

BAHAN	F1 (L:S=10:0)	F2 (L:S=8:2)	F3 (L:S=6:4)	F4 (L:S=5:5)	F5 (L:S=4:6)	F6 (L:S=2:8)	F7 (L:S=0:10)
<i>Suspensi Lactobacillus sp.</i>	10 ⁹ Cfu/ml	10 ⁹ Cfu/ml	10 ⁹ Cfu/ml	10 ⁹ Cfu/ml	10 ⁹ Cfu/ml	10 ⁹ Cfu/ml	10 ⁹ Cfu/ml
Kopolimer Asam Metakrilat Tipe L	2,5 %	2 %	1,5%	1,25%	1,0 %	0,5%	0,0 %
Kopolimer Asam Metakrilat Tipe S	0.0 %	0.5 %	1,0 %	1,25 %	1,5%	2,0%	2,5 %
MRS Broth	1,25%	1,25%	1,25%	1,25%	1,25%	1,25%	1,25%
Aquadestilata Ad 500 ml	500 ml	500 ml	500 ml	500 ml	500 ml	500 ml	500 ml

4.6.6. Uji Mikropartikel

4.6.6.1. Karakterisasi Fisikokimia Mikropartikel

4.6.6.1.1. Ukuran Partikel

Penentuan ukuran partikel dilakukan dengan metode mikroskopi optic Olympus[®] perbesaran lensa okuler 10x dan perbesaran lensa objektif 10x. Skala okuler dikalibrasi dengan cara memasang mikrometer okuler pada mikroskop, dilakukan pengamatan hingga kedua skala terlihat jelas, kemudian garis awal skala objektif dihipit sehingga didapatkan garis yang tepat berhimpit pada kedua skala. Ditentukan harga okuler diukur mikropartikel dengan cara meletakkan mikropartikel pada obyek glass dan dilakukan pengukuran diameter mikropartikel, Setelah itu dilakukan pengelompokan ukuran partikel dari terkecil sampai terbesar dan dibagi kedalam beberapa interval dan kelas

4.6.6.1.2. Kadar air

Ditentukan dengan Moisture Analyzer HB43-S Metler Toledo

Tekan tombol penghidup mesin pengukur kadar air. Penutup alat dibuka, masukkan sampel pan kosong dimasukkan ke dalam *sample pan handler*. Turunkan penutup alat yang akan secara otomatis menara ke kondisi *zero*. Sampel diletakkan kedalam *sample pan* minimal 500 mg. Kadar air dapat dibaca pada alat monitor.

4.6.6.1.3. Morfologi bentuk dan morfologi permukaan

Sampel serbuk diletakkan pada *sample holder* terbuat dari aluminium yang dilapisi dengan emas sampai ketebalan 10 nm. Sampel kemudian diamatai pada berbagai perbesaran. Voltase diatur pada 20 k V dan arus 12 mV

4.6.6.1.4. Analisis Thermal dengan DTA

Kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S dan mikropartikel yang terbentuk diperiksa

Thermal Profil mikropartikel dengan alat DTA dengan maksud untuk mengetahui titik lebur dan profil termogram proses peleburan bahan. Cara pengerjaan pemeriksaan DTA sebagai berikut. Sampel padat dalam jumlah 5 mg yang ditimbang dalam *crimper* ditutup dengan alat penekan. *Crimper* diletakkan dalam tungku pemanas dengan kecepatan pemanasan 10^0 C/menit. Dilakukan pengamatan pada suhu antara 30^0 C – 300^0 C.

4.6.6.1.5. Analisis Difraksi Sinar X

Tujuan pemeriksaan ini adalah untuk mengetahui parameter kristalografi polimer berdasarkan pada analisis puncak-puncak difraksi 2θ tertentu pada difraktogram XRD. Sampel digerus dalam mortir agat sampai halus dan rata (diameter 100 mesh), lalu dimasukkan ke dalam pengering hampa udara dengan pengering silika gel biru. Setelah dimasukkan ke dalam sampel holder sampai penuh dan sedikit ditekan sampai rata. Sampel kemudian dimasukkan dalam difraktogram sinar X. Sumber radiasi sinar X yang digunakan adalah Cu-K α dengan filter Ni ($\lambda=1.542$ A). Pengamatan dilakukan pada sudut 2θ dari 5^0 sampai 40^0 , kecepatan perubahan sudut 0.01 – 0,02/detik, tegangan 40k V, arus 10 mA, jumlah impuls 1×10^5 det-1

4.6.6.1.6.. Analisis FTIR

Analisis kualitatif dilakukan dengan . Spektroskopi FTIR seperti butir 4.6.1.2.

4.6.6.2. Uji Kapasitas Penjebakan

Uji kapasitas penjebakan meliputi uji daya proteksi terhadap suhu, uji efisiensi penjebakan dan uji proteksi asam.

4.6.6.2.1. Uji Daya Proteksi Terhadap Suhu

Ditimbang mikropartikel 100 miligram dilarutkan pada larutan bufer fosfat steril pH 7. Larutan dikocok dalam erlenmeyer dengan menggunakan shaker selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 10 seri masing masing 1:10. Masing masing pengenceran diambil 1 ml dan dituang dalam plate. Ke dalam masing masing plate tambahkan 9 ml dan ditanam pada media *de Man Ragosa Shorpe* agar (MRS agar). Tentukan angka lempeng total pada masing masing pengenceran seperti metode 4.3.6.2.2.

4.6.6.2.2. Uji Efisiensi Penjebakan

1. Pencucian mikropartikel :

Sebelum dilakukan uji efisiensi penjebakan terlebih dahulu dilakukan pencucian mikropartikel untuk menghilangkan fase padat yang menempel diluar mikropartikel sehingga menimbulkan gangguan pemeriksaan kadar. Mikropartikel (F1-F7) di kocok dengan 100 ml aquades steril selama 1 jam pada suhu 37⁰ C. Supernatan didekantasi dan mikropartikel dibilas dengan aquades steril 2 kali a 30 ml. Hasil dekantasi dan supernatan air suling steril pembilas dikumpulkan dan ditentukan transmittan pada λ 580 (sama dengan prosedur 4.6.3.3) dan ditentukan ALT (sama seperti metode 4,3,6,2,2,)

2. Penentuan biomasa *Lactobacillus sp.* dalam mikropartikel

Mikropartikel yang telah dicuci (4.7.3.1.) dikeringkan pada suhu 50⁰ C, ditimbang sampai bobot konstan. Mikropartikel kering dikocok dengan larutan bufer fosfat steril pH 7.0 pada suhu 37⁰ C selama 2 jam. Ditentukan Efisiensi Penjebakan Biomasa dengan mengukur transmittan

4.6.6.2.3. Uji Daya Proteksi Terhadap Asam

Ditimbang 100 mg Mikropartikel (F1-F7) di kocok dengan 100 ml larutan HCL steril pH 1,2 selama 2 jam pada suhu 37⁰ C. Ditentukan angka lempeng total (ALT) sama dengan metode 4.6.3.3.

4.6.6.3. Uji Kapasitas pelepasan

Uji pelepasan adalah uji terhadap pelepasan *lactobcilus sp.* dari mikropartikel. Pelepasan diukur dari biomasa bakteri (Epel 1) dan pelepasan *Lactobacilviabel* (Epel 2) dari mikropartikel pada media pelepasan HCl pH

1.2 yang merupakan suasana pH lambung dan media pelepasan buffer fosfat pH 6.8 yang merupakan pH intestin (Huckle, B.D., 2011).

4.6.6.3.1. Uji efisiensi pelepasan biomasa dan bakteri viabel

100 mg mikropartikel dimasukkan dalam 100 ml HCl pH 1,2 selama 2 jam kemudian HCl pH 1,2 diganti dengan media bufer fosfat pH 6,8 dan di kocok pada suhu 37⁰ C. Pada menit ke 2, 4, 6, 8, 10, 12 dan 14. Diambil 3 ml sampel untuk uji pelepasan biomasa dengan mengukur transmitant (efisiensi pelepasan biomasa) dan uji pelepasan *Lactobacillus sp. viabel* dengan pengukuran ALT (efisiensi pelepasan bakteri viabel)

Penjelasan masing masing analisis adalah sebagai berikut :

1. Mannova

Untuk mengetahui pengaruh kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S dilakukan analisis statistik Mannova pada setiap variabel tergantung. Dari analisis tersebut bila angka kemaknaan (*significant figure*) < 0,05 maka berarti ada perbedaan bermakna minimal satu pasang data. Untuk mengetahui perbedaan antara formula maka analisis dilanjutkan dengan Posthoc LSD (*Least Square Difference*)

2. Simplex lattice design

Implementasi *simplex lattice design* menggunakan beberapa formula dengan proporsi kadar polimer yang berbeda yang diharapkan dapat digunakan untuk memprediksi hasil yang menunjukkan formula optimal. Hasil eksperimental digunakan untuk menentukan persamaan simplex (polynomial) yang dapat digunakan untuk memperkirakan hasil pada beberapa proporsi kadar yang optimal. Analisis formula optimal dapat dilakukan pada masing masing formula dan juga bisa dilakukan pada keseluruhan formula.

1. Formula optimum untuk masing masing variabel

$$\text{Rumus : } Y = B1 (A) + B2(B) + B12 (A)(B)$$

Y = respons (Variabel tergantung)

B1 = respons untuk faktor A 100%

B2 = respons untuk faktor B 100%

B12 = respons untuk faktor A 50% dan B50%

2. Formula optimum untuk semua variabel

Respon Total dari Masing-Masing Respons dari Setiap Formula dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$R \text{ Total} = R^1 + R^2 + R^3$$

$R^{1,2,3,n}$ = respons dari masing-masing evaluasi dalam satu Formula

Masing-masing parameter diberi bobot sesuai keutamannya. Jumlah keseluruhan bobot = 1

Mengingat satuan respons tidak sama, maka perlu dilakukan standarisasi penilaian respons dengan menggunakan rumus :

$$N = \frac{X - X \text{ min}}{X \text{ max} - X \text{ min}}$$

Dalam penelitian ini pembobotan dilakukan dengan urutan sebagai berikut :

- | | |
|--------------------------------|-------|
| 1. Kadar Air | = 1/6 |
| 2. Ukuran Partikel | = 1/6 |
| 3. Efisiensi Penjebakan | = 1/6 |
| 4. Daya Proteksi | = 1/6 |
| 5. Efisiensi Pelepasan | = 1/6 |
| 6. Efektivitas Immunomodulator | = 1/6 |

$$\text{Total} = 6/6 = 1$$

$R \text{ Total} = (\text{bobot} \times N \text{ Kadar Air} + \text{bobot} \times N \text{ Ukuran Partikel} + \text{bobot} \times N \text{ Efisiensi Penjebakan} + \text{bobot} \times N \text{ Efisiensi Pelepasan} + \text{bobot} \times \text{daya Proteksi} + \text{bobot} \times N \text{ Efek Immunomodulator})$

Table 4.2. Rancangan Pengolahan Data dengan Simplex Lattice dari Mkropartikel bakteri *lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dengan matriks kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S

Replikasi	F1	F2	F-3	F-4	F-5	F-6	F7
1							
2							
3							
X							
SD							

Bab 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.A. HASIL YANG DICAPAI

5.1.. Hasil Karakterisasi Kopolimer Asam Metakrilat Tipe L dan Tipe S.

Karakterisasi kopolimer asam metakrilat dilakukan dengan pengamatan organoleptis dan analisis spektroskopi FTIR. Hasil disajikan dalam tabel 5.1. sebagai berikut :

Tabel V.1. Hasil Karakterisasi Kopolimer Asam Metakrilat Tipe L dan Tipe S
Dengan analisis FTIR

No	Pemeriksaan	Hasil Pemeriksaan Kopolimer Asam Metakrilat Tipe L	Hasil Pemeriksaan Kopolimer Asam Metakrilat Tipe S	Rujukan Literatur
1	Organoleptis	Serbuk halus, putih, tidak berbau dan tidak berasa	Serbuk halus, putih, tidak berbau dan tidak berasa	Serbuk halus, putih, tidak berbau dan tidak berasa
2	Spektra FTIR	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gelombang (cm ⁻¹)	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹) ^{**}
	-Gugus C=O Asam Karboksilat	1.731.12 cm ⁻¹	1.485,31 cm ⁻¹	1.600-1400 cm ⁻¹
	-Gugus C=O Ester	1731.00 cm ⁻¹	1731.12 cm ⁻¹	1750-1735 cm ⁻¹
	-Gugus OH Asam Karboksilat	3.517,6 cm ⁻¹	3.500,23 cm ⁻¹	3.500-2.400 cm ⁻¹
	-C-O Ester	1267,21cm ⁻¹	1270.3 cm ⁻¹	1.275 – 1.150 cm ⁻¹

5.2 Hasil Pengukuran pH, bilangan asam, dan viskositas polimer

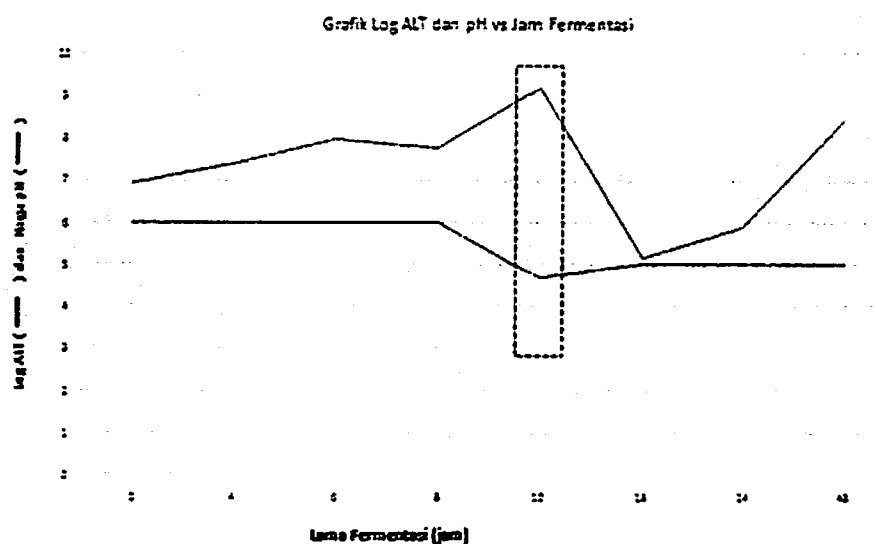
Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel V.1 berikut ini.

Tabel V.1 Hasil pengukuran bilangan asam, pH, dan viskositas larutan kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S dengan pelarut isopropanol (n=3)

Kombinasi Kopolimer Tipe L dan Tipe S	Sifat Kimia-Fisika		
	Bilangan Asam	pH	Viskositas (Cps)
L:S=10:0	301.48 ± 9.37	4.07 ± 0.16	0.256 ± 0.03
L:S=8:2	280.69 ± 14.17	4.08 ± 0.27	0.284 ± 0.27
L:S=6:4	249.05 ± 23.78	4.18 ± 0.25	0.293 ± 0.25
L:S=5:5	242.96 ± 9.03	4.22 ± 0.24	0.297 ± 0.24
L:S=4:6	239.45 ± 8.78	4.27 ± 0.23	0.300 ± 0.23
L:S=2:8	202.97 ± 1.76	4.37 ± 0.21	0.308 ± 0,21
L:S =0:10	186.95 ± 5.67	4.47 ± 0.23	0.310 ± 0.23

5.3. Hasil Pengujian Waktu Optimasi Pertumbuhan *Lactobacillus* sp.

HASIL :



Kesimpulan :

Lama Fermentasi optimal adalah 12 jam, karena Log ALT paling tinggi dan pH paling rendah

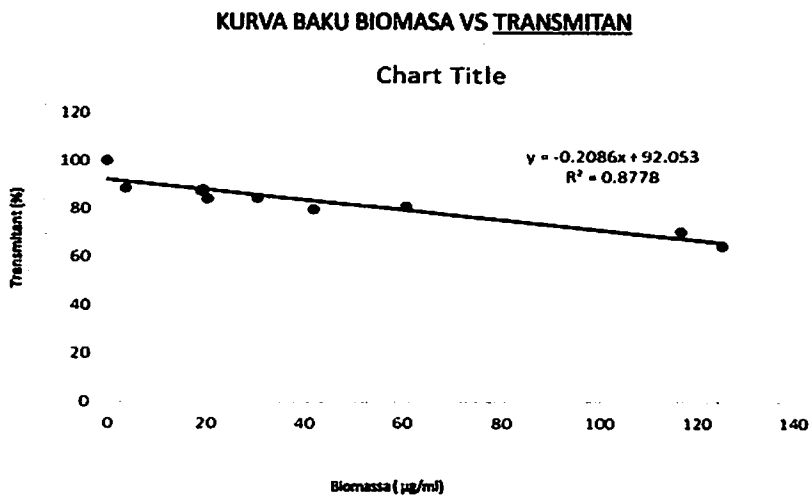
Gambar 5.1. Kurva Uji Waktu Optimasi *Lactobacillus* sp.

Hasil Pengukuran Korelasi Biomassa dan Transmittan
 Tabel 5.3. Penetapan korelasi biomassa dengan transmittan

Penetapan Kurva Baku Korelasi Biomasa *Lactobacillus acidophillus* (Cfu/ml) dengan Transmittan (%)

Replikasi	Biomasa (ug/ml)	Tmasmitan (%)
1	0,00	100,00
2	3,04	98,80
3	3,81	88,80
4	19,05	88,10
5	19,40	87,50
6	20,25	84,30
7	30,40	84,50
8	41,70	79,90
9	60,80	81,00
10	121,50	56,60
11	125,10	64,80

25



Gambar : Kurva baku hubungan transmittan (%) dan Biomassa (µg/ml) dari suspensi *Lactobacillus acidophillus*

20

5.4.. Hasil pengukuran Masa, Viabilitas, dan pH suspensi *Lactobacillus sp.* dalam air steril.

Tabel 5.4. Hasil pengukuran masa, viabilitas, dan pH dari suspensi *Lactobacillus sp.* dalam air steril (n=3)

Formula	Massa ($\mu\text{g/ml}$)	Viabilitas (cfu/ml)	pH
F1	303,80 \pm 0,28	10,775 \pm 0,19	4,26 \pm 0,06
F2	299,80 \pm 0,24	10,737 \pm 0,22	4,30 \pm 0,14
F3	294,20 \pm 0,23	10,743 \pm 0,22	4,46 \pm 0,11
F4	301,70 \pm 0,25	10,792 \pm 0,19	4,26 \pm 0,25
F5	298,60 \pm 0,22	10,769 \pm 0,19	4,10 \pm 0,17
F6	398,60 \pm 0,28	10,702 \pm 0,21	4,34 \pm 0,15
F7	397,90 \pm 0,27	10,752 \pm 0,21	4,18 \pm 0,18

Keterangan : F1 (L:S= 10:0), F2(L:S=8:2), F3(L:S=6:4),
F4(L:S=5:5), F5=(L:S=4:6), F6 (L:S=2:8), F7 (L:S=0:10)

5.3 Hasil pengukuran viskositas, pH, dan densitas suspensi *Lactobacillus sp.* dalam larutan matriks

Tabel 5.5. Hasil pengukuran viskositas, pH, dan densitas suspensi *Lactobacillus Sp.* dalam larutan kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S (n=3)

Formula	Viskositas (Cps)	pH	Densitas
F1	1,584 \pm 0,35	5,21 \pm 0,04	1,0047 \pm 0,003
F2	1,778 \pm 0,19	5,30 \pm 0,01	1,0041 \pm 0,004
F3	1,801 \pm 0,26	5,14 \pm 0,02	1,0037 \pm 0,002
F4	2,008 \pm 0,44	5,20 \pm 0,01	1,0042 \pm 0,002
F5	2,157 \pm 0,38	5,12 \pm 0,21	1,0035 \pm 0,004
F6	2,409 \pm 0,33	5,20 \pm 0,01	1,0038 \pm 0,002
F7	2,663 \pm 0,18	5,23 \pm 0,09	1,0045 \pm 0,000

Keterangan : F1 (L:S= 10:0), F2(L:S=8:2), F3(L:S=6:4),
F4(L:S=5:5), F5= (L:S=4:6), F6 (L:S=2:8), F7 (L:S=0:10)

Tabel 5.6. Hasil pengukuran diameter partikel (μm) dan moisture content (kadar air) (%) dari mikropartikel *Lactobacillus sp.* dengan matriks kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S (n=3)

Formula	Diametr Partikel (μm)	MC (%)
F1	13,00 \pm 0,15	7,26 \pm 0,57
F2	13,34 \pm 0,70	8,37 \pm 1,68
F3	13,44 \pm 0,17	7,83 \pm 0,87
F4	14,11 \pm 0,69	6,61 \pm 0,57
F5	13,55 \pm 0,40	8,18 \pm 0,57
F6	13,29 \pm 0,34	7,47 \pm 1,23
F7	13,83 \pm 1,35	8,04 \pm 0,80

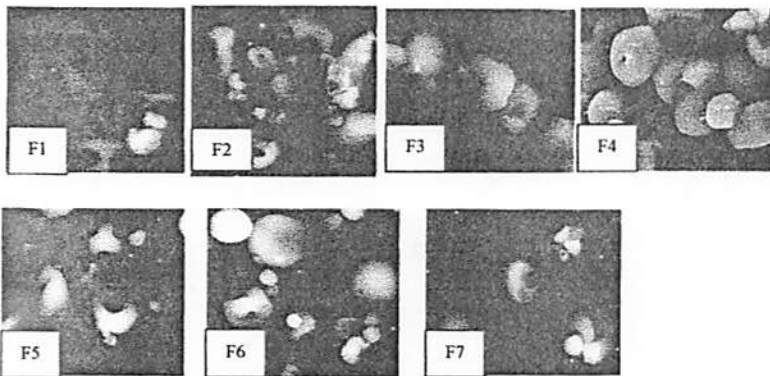
Keterangan : F1 (L:S= 10:0), F2(L:S=8:2), F3(L:S=6:4), F4(L:S=5:5), F5=(L:S=4:6), F6 (L:S=2:8), F7 (L:S=0:10)

Dari hasil analisis Manova diameter partikel ($\alpha = 0,05$) didapatkan harga *significancy* = 0,551 ($> 0,05$) menunjukkan bahwa diameter partikel antar formula memiliki perbedaan yang tidak bermakna sehingga tidak dilanjutkan uji *post hoc*. Walaupun perbedaan tidak bermakna, namun ada kecenderungan peningkatan diameter partikel dari Formula 1 ke formula 4 dan diameter partikel dari formula 4 ke formula 7. Diameter partikel yang paling besar adalah mikropartikel formula 4 (kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S dengan perbandingan 5:5).

MC berkisar antara 6,61% – 8,37% lebih tinggi dibandingkan dengan kadar air ideal yaitu 2-5%. Dengan analisis Manova didapatkan *significancy* 0,377, berarti kadar air antar formula memiliki perbedaan yang tidak bermakna.

5.4.2 Pemeriksaan Morfologi Mikropartikel SEM

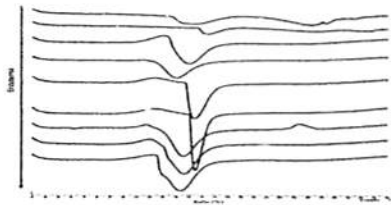
Morfologi bentuk dan morfologi permukaan diperiksa dengan menggunakan SEM dengan hasil tersaji pada Gambar 5.4 berikut ini.



Gambar 5.2 Fotograf mikropartikel dalam matriks kopolimer asam metakrilat kombinasi tipe L dan tipe S dengan perbandingan : 10:0 (F1), 8:2 (F2); 6:4 (F3); 5:5 (F4) 4:6 (F5); 2:8 (F6) dan 0:10 (F7). (Pembesaran 15.000 \times). = bentuk tidak sferis dan permukaan kasar ; = bentuk sferis dan permukaan halus

Uji *Differential Thermal Analyser* (DTA)

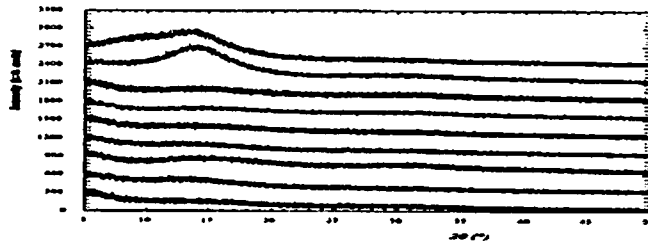
Hasil pemeriksaan DTA tersaji pada Gambar 5.5 sebagai berikut.



Gambar 5.3. Termogram DTA dari kopolimer asam metakrilat tipe L(1), kopolimer asam metakrilat tipe S(2), dan mikropartikel dengan matriks kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S

Hasil Uji Difraksi Sinar X

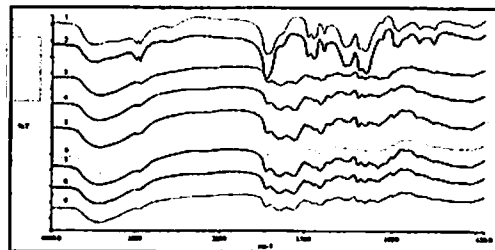
Hasil uji difraksi sinar X tersaji dalam Gambar 5.6.



Gambar 5.4. Difraktogram sinar X kopolimer asam metakrilat Tipe L (1) , Tipe S(2) dan mikropartikel dengan matriks kombinasi tipe L dan tipe S dengan perbandingan 10:0 (3), 8:2(4), 6:4(5), 5:5(6), 4:6(7), 2:8(8) dan 0:10(9).

Analisis Spektroskopi Fourier Transform Infra Red (FTIR)

Hasil analisis spektra FTIR tersaji pada Gambar 5.7 dan Tabel V.9 berikut ini



Gambar 5.5. Spektrogram kopolimer asam metakrilat tipe L (1), tipe S (2) dan mikropartikel *Lactobacillus sp.* dengan matriks kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S pada perbandingan 10:0(3), 8:2(4); 6:4(5); 5:5(6); 4:6(7); 2:8(8) dan 0:10(9)

Tabel 5.7. Hasil uji Viabilitas dan ketahanan terhadap asam serta efisiensi enkapsulasi mikropartikel *Lactobacillus sp.* dengan matriks kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S (n=3)

FORMULA	Viabilitas (%)	Efisiensi Enkapsulasi (%)	Ketahanan Terhadap Asam (%)
F1(L:S=10:0)	22.58 ± 16.71	70.66 ± 19.49	1.58 ± 0.66
F2(L:S=8:2)	23.88 ± 16.19	74.03 ± 15.07	1.67 ± 0,70
F3 (L:S=6:4)	28.99 ± 20.89	81.10 ± 10.38	1.77 ± 0.96
F4 (L:S=5:5)	43.14 ± 13.13	95.65 ± 2.22	1.85 ± 0.93
F5 (L:S= 4:6)	22.05 ± 7.07	77.46 ± 13.68	1.80 ± 1.12
F6 (L:S=2:8)	21.12 ± 12.21	65.63 ± 8.67	1.53 ± 1.01
F7(L:S=0:10)	15.06 ± 7.84	53.34 ± 26.31	1.34 ± 0.06

Hasil analisis statistik manova viabilitas ($\alpha = 0,05$) mendapatkan *significancy* = 0,037 menunjukkan minimal ada satu pasang data antar formula yang berbeda secara bermakna, sehingga perlu dilakukan uji *post hoc* LSD untuk membuktikan formula yang berbeda secara bermakna. Hasil uji *post hoc* LSD dapat dilihat pada Tabel 5.8.

Dari Tabel 5.7 dapat diketahui viabilitas terbesar, efisiensi enkapsulasi, dan ketahanan terhadap asam pada mikropartikel dengan kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S=5:5 (formula 4). Secara statistik daya proteksi terhadap suhu antara formula 4 dan formula 1 berbeda secara bermakna. Efisiensi pelepasan antara formula 4 dengan formula 1 dan formula 7 berbeda secara bermakna.

Dari hasil analisis statistik Manova efisiensi enkapsulasi ($\alpha = 0,05$) didapatkan *significancy* = 0,010 menunjukkan minimal ada satu pasang data antar formula yang berbeda secara bermakna, sehingga perlu dilakukan uji *post hoc* untuk membuktikan formula yang berbeda secara bermakna. Hasil uji *post hoc* dapat dilihat pada Tabel V.12.

Ketahanan terhadap asam membuktikan perbedaan yang tidak bermakna antar formula. Keunggulan kombinasi, terutama perbandingan 5:5 terkait dengan jumlah ikatan hidrogen intermolekul yang terbentuk paling banyak pada perbandingan 5:5 seperti telah diuraikan dalam pembahasan sebelumnya.

Formula 4 mempunyai viabilitas 1,91 kali lebih besar dibandingkan formula 1 (matriks tunggal tipe L) dan 2,86 kali lebih besar dibandingkan formula 7 (matriks tunggal tipe S). Ditinjau dari efisiensi pengebakan, formula 4 mempunyai harga paling besar, yaitu 1,35 kali dibandingkan matriks tunggal tipe L dan 1,79 kali lebih besar dibandingkan tipe S. Viabilitas formula 4 paling tinggi, yaitu 1,17 kali lebih besar dibandingkan matriks tunggal tipe L dan 1.38 kali lebih besar dibandingkan matriks tunggal tipe S.

Hasil analisis statistik manova daya proteksi terhadap suhu ($\alpha = 0,05$) mendapatkan *significancy* = 0,037 menunjukkan minimal ada satu pasang data antar formula yang berbeda secara bermakna, sehingga perlu dilakukan uji *post hoc* LSD untuk membuktikan formula yang berbeda secara bermakna. Hasil uji *post hoc* LSD dapat dilihat pada Tabel V.11.

Tabel 5.8 Hasil uji *post hoc* LSD viabilitas dari mikropartikel dengan kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S (n=3)

Formula (Berbagai L:S)	F1 10:0	F2 8:2	F3 6:4	F4 5:5	F5 4:6	F6 2:8	F7 0:10
F1(10:0)		-	-	+	-	-	-
F2(8:2)	-		-	-	-	-	-
F3(6:4)	-	-		-	-	-	-
F4(5:5)	+	-	-		-	-	-
F5(4:6)	-	-	-	-		-	-
F6(2:8)	-	-	-	-	-		-
F7(0:10)	-	-	-	-	-	-	

Keterangan: + = Perbedaan bermakna - = Perbedaan tidak bermakna

Dari Tabel 5.7 dapat diketahui viabilitas terbesar, efisiensi enkapsulasi, dan ketahanan terhadap asam pada mikropartikel dengan kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S=5:5 (formula 4). Secara statistik viabilitas antara formula 4 dan formula 1 berbeda secara bermakna.

Dari hasil analisis statistik Manova efisiensi penjebakan ($\alpha = 0,05$) didapatkan *significancy* = 0,010 menunjukkan minimal ada satu pasang data antar formula yang berbeda secara bermakna, sehingga perlu dilakukan uji *post hoc* untuk membuktikan formula yang berbeda secara bermakna. Hasil uji *post hoc* dapat dilihat pada Tabel 5.9.

Tabel 5.9. Hasil uji *post hoc* LSD efisiensi enkapsulasi dari mikropartikel dengan kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S (n=3)

Formula	F1 10:0	F2 8:2	F3 6:4	F4 5:5	F5 4:6	F6 2:8	F7 0:1 0
F1(10:0)		-	-	+	-	-	-
F2(8:2)	-		-	-	-	-	-
F3(6:4)	-	-		-	-	-	-
F4(5:5)	+	-	-		-	-	+
F5(4:6)	-	-	-	-		-	-
F6(2:8)	-	-	-	-	-		-
F7(0:10)	-	-	-	+	-	-	

Keterangan: + = Perbedaan bermakna - = Perbedaan tidak bermakna

Ketahanan terhadap asam membuktikan perbedaan yang tidak bermakna antar formula. Keunggulan kombinasi, terutama perbandingan 5:5 terkait dengan jumlah ikatan hidrogen intermolekul yang terbentuk paling banyak pada perbandingan 5:5 seperti telah diuraikan dalam pembahasan sebelumnya.

Pada uji ketahanan terhadap asam, dilakukan penetapan jumlah *Lactobacillus acidophilus* yang hidup dengan metode ALT. Hasil uji disajikan dalam Tabel V.10.

Tabel V.10 Hasil penghitungan ALT *Lactobacillus acidophilus* dari mikropartikel dengan kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S pada beberapa perbandingan setelah pemaparan pada HCl pH 1,2 selama 2 jam (cfu/gram) $\times 10^6$

FORMULA	Log ALT
F1(L:S=10:0)	390,70 \pm 0,56
F2(L:S=8:2)	254,21 \pm 0,37
F3 (L:S=6:4)	385,32 \pm 0,79
F4 (L:S=5:5)	704,97 \pm 0,32
F5 (L:S= 4:6)	347,31 \pm 0,21
F6 (L:S=2:8)	239,74 \pm 0,34
F7(L:S=0:10)	145,14 \pm 0,89

Dari Tabel V.13 dapat disimpulkan bahwa jumlah bakteri masih memenuhi persyaratan mikropartikel probiotik, yaitu 10^6 cfu/gram.

Tabel 5.9. Hasil uji disolusi (biomasa) *Lactobacillus sp* (%) dari mikropartikel dengan matriks kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S pada berbagai perbandingan

pH 2		pH 6,8							
Waktu Menit	F1- F7	Waktu Menit	F1 (10:0)	F2 (8:2)	F3 (6:4)	F4(5:5)	F5 (4:6)	F6 (2:8)	F7(0:10)
120	0	2	8.41	14.14	11.89	3.88	23.47	7.33	24.48
	0	4	13.46	12.25	16.51	6.77	26.63	15.64	41.16
	0	6	75.83	47.24	49.19	22.73	37.16	47.49	56.81
	0	8	82.53	65,78	70.11	49.87	55.03	72.85	74.45
	0	10	86.59	73.52	83.53	69.87	62.50	83.19	80.06
	0	12	83.96	82.62	85.79	76.94	68.06	97.75	88.72
	0	14	100.00	95,97	100.00	87,54	85.39	100.00	100.00
	0	16	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

Hasil perhitungan efisiensi pelepasan biomasa bakteri dan efisiensi pelepasan bakteri *viable* disajikan dalam Tabel V.16 sebagai berikut.

Tabel V.16 Hasil uji efisiensi pelepasan biomassa *Lactobacillus acidophilus* (%), efisiensi pelepasan *Lactobacillus acidophilus viable* (%) dari mikropartikel *Lactobacillus acidophilus* dengan matriks kombinasi kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S (n=3)

FORMULA	Efisiensi Pelepasan Biomassa Bakteri (%)	Efisiensi Pelepasan Bakteri <i>Viable</i> (%)
F1(L:S=10:0)	60.51 ± 14.32	66.50±14.32
F2(L:S=8:2)	55.08 ± 16.82	64.26±14.56
F3 (L:S=6:4)	42.47 ± 6.95	61.65±15.39
F4 (L:S=5:5)	34.40 ± 13.65	48.73±10.38
F5 (L:S= 4:6)	38.45 ± 10.03	55.24± 6.62
F6 (L:S=2:8)	47.79 ± 14.68	61.58±8.42
F7(L:S=0:10)	50.94 ± 14.76	66.50±14.32

Data pada Tabel V.16 menunjukkan bahwa kombinasi tipe L dan tipe S mengakibatkan penurunan efisiensi pelepasan dari formula 1 sampai formula 4 dan mengalami peningkatan dari formula 4 sampai formula 7. Efisiensi pelepasan paling rendah didapatkan pada formula 4 atau formula dengan perbandingan tipe L dan tipe S= 5 : 5. Pada formula 4 efisiensi pelepasan biomasa bakteri 1,76 lebih rendah dibandingkan dengan kopolimer tipe L tunggal dan 1,48 kali lebih rendah dibandingkan dengan tipe S tunggal. Adapun untuk efisiensi pelepasan bakteri *viable*, formula 4 lebih rendah 1,36

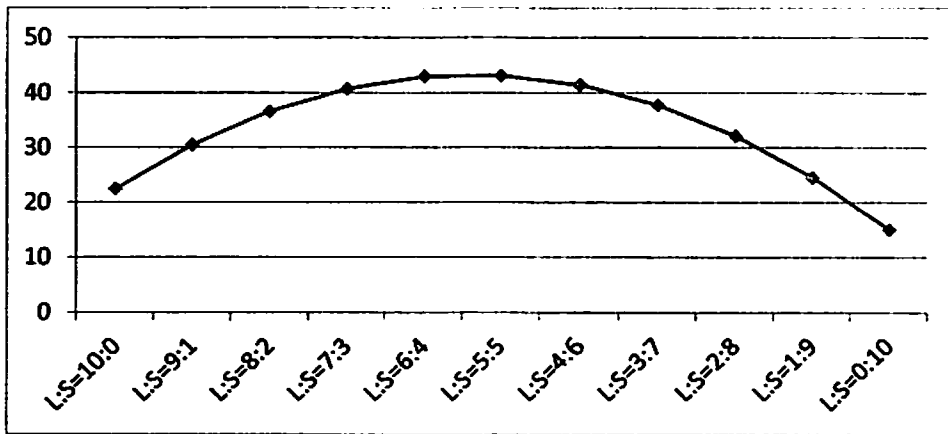
kali dianding kopolimer tipe L dan tipe S.

Dari hasil analisis statistik Manova ($\alpha = 0,05$) didapatkan *significancy* = 0,389 yang berarti ada perbedaan yang tidak bermakna efisiensi pelepasan.

5.7. Hasil Analisis Simplex Lattice Design

Analisis ini diperlukan untuk menentukan Formula Optimal untuk respons

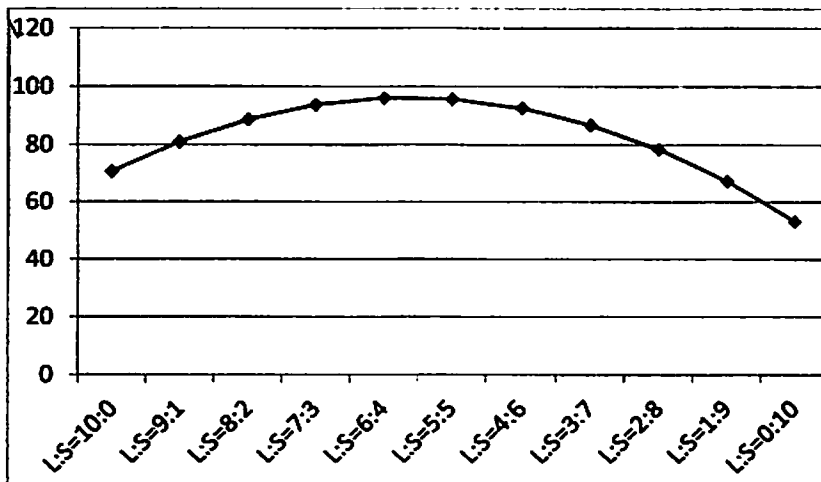
1. Analisis Simplex Lattice Design dari data Viabilitas.



Gambar 5.12. Kurva Viabilitas (%) berdasarkan analisis *simplex lattice design* dari mikropartikel dengan matriks Kopolimer Asam Metakrilat Tipe L dan Tipe S pada perbandingan :10:0. 9:1. 8:2. 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 dan 0:10.

Efisiensi pengebakan optimum dihasilkan oleh mikropartikel Formula 4 (Tipe L dan Tipe S = 5:5)

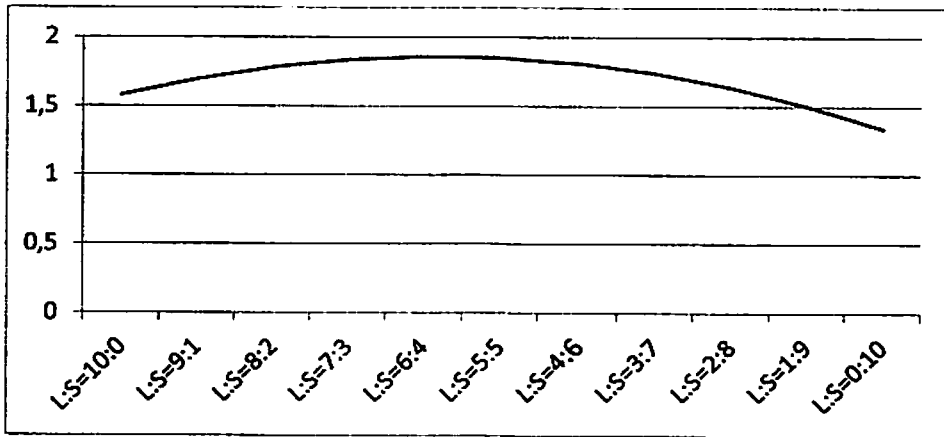
2. Analisis Simplex Lattice Design untuk Efisiensi Enkapsulasi



Gambar 5.13.:Kurva Efisiensi Enkapsulasi (%) berdasarkan analisis *simplex design* dari mikropartikel dengan matriks Kopolimer Asam Metakrilat Tipe L dan Tipe S pada perbandingan :10:0. 9:1. 8:2. 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 dan 0:10.

Efisiensi Enkapsulasi optimum dihasilkan oleh mikropartikel Formula 4 (perbandingan Tipe L dan Tipe S = 5:5)

3. Analisis *Simplex Lattice Design* untuk Ketahanan Terhadap Asam

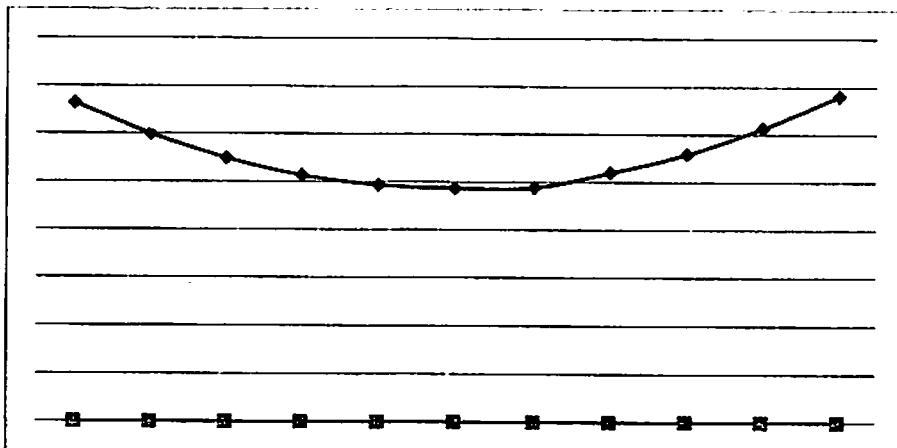


Gambar 5.14. : Kurva Ketahanan Terhadap Asam (%) Berdasarkan perhitungan *simplex lattice design*

Dari Mikropartikel dengan matriks Kopolimer Asam Metakrilat Tipe L dan Tipe S pada perbandingan : 10:0. 9:1. 8:2. 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 dan 0:10.

Ketahanan Terhadap Asam optimum dihasilkan oleh mikropartikel Formula 4 (Perbandingan Tipe L : Tipe S = 5:5)

4. Analisis *Simplex Lattice Design* untuk Efisiensi Disolusi



Gambar 5.15. : Kurva perhitungan simplex lattice design Efisiensi Disolusi Bakteri untuk Formula dengan perbandingan Kopolimer Asam Metakrilat Tipe L:S : 10:0; ; 9:1;8:2;7:3;6:4;5:5;4:6;3:7;2:8;1:9;0:10)

Efisiensi Disolusi Optimum dihasilkan oleh Formula dengan perbandingan tipe L : tipe S = 10:0.

5. Analisis Simplex Lattice Design

$R \text{ Total} = (\text{bobot} \times N \text{ Kadar Air} + \text{bobot} \times N \text{ Ukuran Partikel} + \text{bobot} \times N \text{ Efisiensi Enkapsulasi} + \text{bobot} \times N \text{ Viabilitas} + \text{bobot} \times N \text{ Efek Imunmodulator})$

Tabel V.30 : Hasil perhitungan R Total

Formula	HARGA N x Bobot Kualitas Masing Masing Respons					R TOTAL
	Kadar Air (%)	Ukuran Partikel	Ef. Enkapsulasi	Viabilitas	Ef. Disolusi	
F1(L:S=10:0)	-0.2504	-0.0991	0.0322	0.00225	0.0950	-0.22005
F2(L:S=8:2)	-0.3033	-0.1047	0.0341	0.00238	0.0918	-0,27972
F3(L:S=6:4)	-0.2767	-0.1045	0.0414	0.00253	0.0880	-0,24947
F4(L:S=5:5)	-0.2196	-0.1025	0.0616	0.00264	0.0696	-0,18826
F5(L:S=4:6)	-0.3434	-0.1214	0.0368	0.0029	0.0920	-0,29350
F6 (L:S=2:8)	-0.3038	-0.1223	0.0351	0.0025	0.1026	0,0816
F7(L:S=0:10)	-0.3354	-0.1205	0.0251	0.0022	0.1135	0,0687

BAB 5B. LUARAN YANG DIHASILKAN

NO	LUARAN YANG DICAPAI	LAMPIRAN
1	Draft Artikel	Konsep
2	Mengikuti Seminar Internasional	International Conferece on Applied Pharmaceutical Sciences (18-19 Oktober 2018)
3	Melibatkan Mahasiswa Untuk mengikuti Seminar Internasional	International Conferece on Applied Pharmaceutical Sciences (18-19 Oktober 2018)

BAB 6
RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

NO	RENCANA KERJA	PERKIRAAN JADWAL
1	Penyiapan Bahan Baku : Lactobacillus casei; Kopolimer asam metakrilat Tipe L dan tipe S, MRS Broth	Februari 2019
2	Pembuatan bakteri induk dan Pembuatan Eudragit	Maret 2019
3	Penyiapan spray drying	April 2019
4	Mikroenkapsulasi dengan metode spray drying pada suhu 120 ⁰ c/130 ⁰ C/140 ⁰ dan Laju Alir 10 ml/detik/ 15 ml/detik dan 20 ml/detik	Mei – Juli 2019
5	Evaluasi Mikropartikel	Agustus – September 2019
6	Analisis Hasil	September – Oktober 2019
7	Laporan Akhir	Oktober 2019



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Dari hasil yang diperoleh maka kesimpulan sementara yang dapat dirumuskan adalah :

1. Perbedaan perbandingan ratio kopolimer asam metakrilat tipe L dan tipe S mempengaruhi karakteristik fisik dan pelepasan lactobacillus dari mikropartikel
2. Perbandingan yang menghasilkan karakteristik fisik dan pelepasan yang terbaik adalah perbandingan kopolimer asam metakrilat Tipe L dan Tipe S 1: 1

SARAN

Setelah didapatkan ratio 1:1 selanjutnya perlu dilakukan optimasi proses spray drying untuk suhu inlet dan waktu alir yang berbeda



Bab 7 DAFTAR PUSTAKA

- Almeida, H., Amaral, M. H. and Lobão, P., 2012. Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug delivery. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Vol. 2 No. 6, pp. 01–10.
- Augsburger, L., and Hoag, S., 2008. *Pharmaceutical dosage forms: tablets*. 3rd Ed. Vol. 2. New York: Informa Healthcare USA. pp. 399-437.
- FAO/WHO (Food and Agricultural Organization-World Health Organization), 2001. *Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Cordoba, Argentina.
- Gaur, P.K., Mishra, S., Gautam, R., Singh, A.P., and Yasir, M., 2014. Film coating technology: Past, present and future. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology*, Vol. 1 No. 1, pp. 57-67.
- Gbassi, G.K. and Vandamme, T., 2012. Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, Vol. 4 No. 1, pp. 149–163.
- Gil E.S., and Hudson, S.M., Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Progress in Polymer Science*, Vol. 29 No. 12, pp. 1173-1222.
- Hardiningsih, R., Napitupulu, R.N.R., and Yulinery, T., 2005. Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus casei* pada pH Rendah. *Biodiversitas*, Vol. 7, pp. 15-17.
- Hummel, AS., Hertel, C., Holzappedt WH., and Franz CMAP., 2007. Antibiotic resistences of starter and probiotic starins of lactic acid bacteria. *Applied an Environmental Microbiology* 73(3) : 730-39
- Huq, T., Khan, A., Khan, R.A., Riedl, B., and Lacroix, M., 2013. Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 53 No. 9, pp. 909–916.
- Islam, M. 2010. Microencapsulation of live probiotic bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 20 No. 10, pp. 1367-1377.
- Jain, K.K., 2008. Drug Delivery Systems – An Overview. In: K.K. Jain. *Drug Delivery Systems*, Switzerland: Humana Press, pp. 1.
- Jiang, G., Thanoo, B., and Deluca, P.P., 2002. Effect of osmotic pressure in the solvent extraction phase on BSA release profile from PLGA microspheres. *Pharmaceutical Development and Technology*, Vol. 7 No. 4, pp. 391-399.
- Kumar, B.P., Chandiran, I.S., Bhavya, B., and Sindhuri, M., 2011. Microparticulate drug delivery

- system : a review. *Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research*, Vol. 1 No. 1, pp. 19–37.
- Martin, M.J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M.A., and Morales, M.E., 2014. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Vol. 27, pp. 15-25.
- Mesquita, A.R.C., Silveira, L.P., Cruz Filho, I.J., Lima, V.F., Mota Silveira Filho, V., Araujo, A.A., Silva, L., Araujo, K., and Silva Macedo, L., 2017. Metabolism and physiology of Lactobacilli: a review. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, Vol. 2 No. 2, pp.115-124.
- Mishra, M., and Mishra, B., 2011. Formulation optimization and characterization of spray dried microparticles for inhalation delivery of doxycycline hyclate. *Yakugaku Zasshi*, Vol. 131 No. 12, pp. 1813-1825.
- Nollenberger, K. and Albers, J., 2013. Poly(meth)acrylate-based coatings. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 457 No. 2, pp. 461–469.
- Perrie, Y., and Rades, T., 2010. *Pharmaceutics: Drug Delivery and Targeting*. London: Pharmaceutical press. p. 8-14.
- Pithva, S., Ambalam, P., Dave, J.M., Vyas, B.R., 2003. Potential of probiotic *Lactobacillus* strains as food additives. *Food Additives*. InTech. pp. 175-190.
- Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W., and Heng, P.W.S., 2013. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, Vol. 116 No. 2, pp. 369–381.
- Solanki, H.K., Pawar, D.D., Shah, D.A., Prajapati, V.D., Jani, G.K., Mulla, A.M., and Thakar, P.M., 2013. Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *Biomed Research International*, Vol. 2013, pp. 1-21.
- Sahoo, S. K., Behera, A.L., Mallik, B., Patil, S.V., 2011. Effect of plasticizers on various characteristics of eudragit microspheres formulated by solvent evaporation method. Singh, A., Dubey, H., Shukla, I., and Singh, D.P., 2012. Pulsatile drug delivery system : an approach of medication according to circadian rhythm. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Vol. 2 No. 3, pp. 166–176.
- Sonje, A. and Chandra, A., 2013. Comprehensive review on eudragit polymers. *International Research Journal of Pharmacy*, Vol. 4 No. 5, pp. 71–74.
- Zhu, Y., Shah, N.H., Malick W., Infed M.H., McGinity, J.W. 2002. Solid-state plasticization of a polymer with chlorpheniramine maleate and triethyl citate. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 241. No. 2 , 301-310



LAMPIRAN
DRAFT ARTIKEL

ABSTRACT ICOAPS

THE EFFECT OF L TYPE METHACRYLIC ACID COPOLYMER CONCENTRATION ON THE PHYSICAL CHARACTERISTICS OF *Lactobacillus casei* MICROPARTICLES

Sugiyartono, Widji Soeratri, Dewi Isadiartuti

The microencapsulation process aims to protect drug, reduce degradation of drug compounds and to provide pulsatile release effects. One of the active ingredients that require microencapsulation methods is *Lactobacillus casei*. As a probiotics, *Lactobacillus casei* has no acid resistant properties, while the target release is commonly in the intestine. The objective of this study was to compare the effect of L type methacrylic acid copolymer as an matrix (0,5%, 0,75% and 1,0%) on the physical characteristics of probiotic microparticles made by spray drying process with inlet temperature of 120 °C.

The result indicated that the particle size was increased and the moisture content was decreased with increasing of matrix level. Through SEM examination, it could be seen that the morphology of miroparticles had no spherical form, there was basin, but no porous. In addition, FT –IR examinations performed in this study to determine the formation of hydrogen bonds in the tree formulas characterized by shifting of wave number in C=O ester and OH hydroxyl groups . The result of FT-IR indicated a decrease in the wavenumber of the C=O esteric acid and OH hydroxyl groups on the third formula of microparticles when compared with the L-type methacrylic acid copolymer before it was encapsulated.

Keyword : microencapsulation, probiotics, microparticles, L-type methacrylic acid copolymers, spray drying, physical characteristic

1. Introduction

Probiotic bacteria are living bacteria when administered in enough number can provide beneficial health effects in humans. In the oral dosage form , the viable bacteria is sugested contain at least 10^7 CFU per ml or per gram (Teanpaisan, 2012). The probiotic culture should be viabel at the target organ in human, that is in intestine Many types of bacteria are included in the probiotics groups. Most of them belong to the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacteria*. From the *Lactobacillus* genus it is known that *Lactobacillus casei* is widely used commercially as it is resistant to pH 3, resistant to pepsin, and has high adhesion in the intestine (Heller, 2001; Touhy et al., 2003;)

The viability of *Lactoacillus casei* is influenced by several factors: oxygen, high temperature, digestive enzymes and gastric acid pH. It is reported that 90% of *Lactobacillus casei* bacteria death when it is exposed with gastric acid in the GIT (Krasaekpoot, 2003; Corcoran et al., 2005; Meng et al., 2008). To protect the viabilty, the bacteria were encapsulated by microencapsulating poccus using L-type methacrylic acid copolymer as a matrices (Molema, 2001; Rajpurohit et al., 2010; McGinity, 2008; Benita and Tamilvanan, 2006). Methacrylic acid copolymers are weakly acidic, insoluble in acidic conditions and even capable of forming hydrogen bonds, thereby forming a dense polymer structure and capable of protecting the trapped active ingredient (Marechal, 2007). A hydrogen bond is formed between the H atoms of the carboxylate group with the O atoms of the carbonyl group. In neutral or hydrogen bonding conditions it is discontinued so that the methacrylic acid copolymers become loose structures and are able to release active ingredients (Binder and Zirbs, 2007; Attwood and Florence, 2008). L-type methacrylic acid copolymers have many carboxylic acid groups. This has led to L-type methacrylic acid copolymers having a pH-dependent solubility, due to the ability to receive and release protons (Gil and Hudson, 2004). Carboxylic groups receive protons at low pH and release protons at high p (Grainger and El Sayed, 2004; Nguyen DA and Fogler HS, 2005). The released proton causes the carboxylate groups to become negatively charged and there is a repulsion force between the carboxylate groups causing swelling to occur. While the proton received will produce hydrogen bonds on the L-type metacrylic

acid copolymer structure. In this study a copolymer with a concentration of 0.50%, 0.75%, and 1.00% were used

The mixture of polymer and bacteria than dried using spray drying methode. Spray drying was chosen in these research because it is simple and low cost method. Spray drying technique is known to take a short time and the process cost is cheaper. High temperatures in the microencapsulation process with spray drying can affect bacterial viability, but previous studies have reported that with the addition of a protective matrix, bacterial viability is tolerable (Desmond et al., 2002; Corcoran et al. 2005; Sugiyartono et al., 2014)

The aim of the present study was to investigate the influence of L-type methacrylic acid copolymer on the physical characteristic of *Lactobacillus casei* FNCC0090 microparticles.

2. Materials and Methods

Matrices

L-type methacrylic acid copolymer was a kind gift from Evonik (Germany) was used as matrices because it doesnt soluble in the acid condition and will soluble in the basic conditions. In the acid condition these polymer will yield hydrogen bond that strengthen the structure.

Culture preparation

The bacteria strain *Lactobacillus casei* FNCC 0090 was obtained from Center for Food and Nutrition Studies of Gadjah Mada University. The bacteria were stored to inactivated at -4°C . *Lactobacillus casei* from the culture of the parent stock in breeding by taking as much as one $\hat{\text{O}}\text{se}$ of bacterial solids then inserted into the MRS broth and thoroughly mixed for 48 hours at 37°C . The culture of the bacteria is taken several $\hat{\text{O}}\text{se}$ and swiped on the MRS agar and then was incubated at 37°C . for 48 hours. The culture named *Lactobacillus casei* starter. The *Lactobacillus casei* starter can be stored at 4°C with a maximum storage time of one month (if more than one month is rejuvenated)

The bacterias are activated in reconstituted in MRS media as a stock suspension.

L-type methacrylic acid copolymer (Pharmaceutical Grade) was a kind gift from Evonik; Media de Man Ragosa Shorpe (MRS), AA (Food Grade)

Microparticles Preparation.

Lactobacillus casei FNCC 0090 was cultured by inoculating into 50 ml MRS Broth overnight at 37°C . The culture was than poured and mixed into 450 ml MRS Broth. The culture store at 37°C for 48 h. The cells were harvested by centrifuging from MRS Broth and rinse three times with 0,9 % NaCl solution.

The bacteria than reconstitued with solution containing the mixture of L-type methacrylic acid copolymer with the concentration are: 0,50%, 0.75%, and 1% and MRS 1% The suspension should contain *Lactobacillus casei* FNCC 0090 approximately 10^9 CFU. The mixture of *Lactobacillus casei* FNCC 0090 , Copolymer, and MRS, was heated at 50°C for 30 min, then spray dried with spray dryer Buchi B-290 type at 120°C as an inlet temperatur and 60°C as an outlet temperature. Each spray drying process was conducted in triplicate. The microparticles store in selaed polyethylene bags at 25°C

Characterization of microparticles

1. The morfologies of the microparticles were evaluated using scanning electron microscopy (SEM) FEI Type : Inspect-S50.

2. FT – IR Investigation.

The IR Spectroscopy was used to microparticles sructural identify hydrogen bond resulted in polymer. Samples of 0.5-1.5 mg of powder are mixed with KBr crystals of 200 mg with a sample

ratio: KBr = 1: 100 and crushed to homogeneous and then crushed using a KBr pellet printer to form a transparent pellet. The pellet is placed into a spectra sample holder measured using Jasco FTIR spectroscopy with a wavelength of 4000-400 cm^{-1} . FTIR analysis was performed on the sample.

3. Moisture Content (MC) Assay

The microparticle sample was tested for moisture content using a Moisture tool Analyzer (HB43-S Mettler Toledo). By way of ensuring in advance the electrical connection on the Moisture Analyzer has been installed. Press the << On / Off >> button to start the tool. After the appliance is on, wait until the screen shows the view (0,000g). Then open the tool lid, if the screen has shown a blank pan, insert a blank pan sample into the sample pan handler. Lower the tool cover which will automatically tower to "zero" condition.

4. The encapsulation efficiency test is performed by determining the absorbance or % transmittance to calculate the bacteria biomass (by the UV-Vis spectrophotometer)before spray drying process which is then compared with the amount of biomass in the microparticles.

5. Viability Test After Spray Drying Process

The viability test was performed by measuring TPC values and TPC *Lactobacillus casei* FNCC 0090 logs in the spray drying microparticles of each formula and TPC and TPC Log values prior to the spray drying process. The TPC procedure before the spray drying process is the same as point 4.6.5b. The calculation of the number of probiotic bacteria is expressed with percentage

For TPC procedure after spray drying process is 0.5 gram of powder or solid mixed with 9 mL of phosphate buffer saline (PBS with pH = 7,2) sterile and divortex solution. Dilution of 1:10 as much as 10 dilutions was performed using sterile PBS, each diluting 1 mL dipipet to be inserted into the plate then added 9 mL MRS for sterile into the plate, the plate was shaken until the sample was dispersed evenly. After the MRS medium to solidify, the plate is incubated at 32 $^{\circ}\text{C}$ for 48 hours. The calculation of the number of probiotic bacteria is expressed with percentage

3. Results

3.1.Microparticles Morphology examination

Morphology of microparticles observed using Scanning Electron Microscopy (SEM) can be seen in the **Figure 1**. The spray drying process produced microparticles in sizes ranging between 1-5 μm . The result showed the shape and surface morphologies of microparticles. The microparticles of formula 1 (Figure 1A) were irregular, not spherical, and showed many

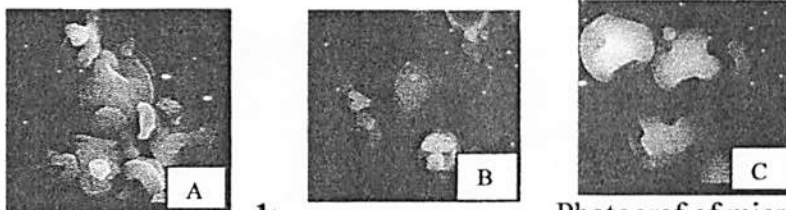


Figure 1: Photograph of microparticles *Lactobacillus casei* using L-type methacrylic copolymer of 0,50% (A); 0,75% (B), and 1,00% (C) taken by Scanning Electron Microscopy (SEM)

hollows. The surface of microparticles were wrinkled compare with microparticles from other formulas.. The microparticles formula 2 (Figure 1B) were not spherical but the surface were smoother. The formula 3 produced the smoothest surface microparticles.

3.2. FT-IR Investigation

It can be seen from Figure 2 that the absorption band or spectral peak widening of carbonyl group (C=O) and hydroxyl group (OH). appears decrease frequency in the microparticles compare with absorption band of copolymer. The wave number of F1= 1,718,24 cm^{-1} ; F2=1,721,15 cm^{-1} and F3= 1,714,5 cm^{-1} for carbonyl group (C=O). and F1=3437,13; F2: 3418,9 and F3= 3426,6 for hydroxyl group. The copolymer have absorption band 1724,17 (carbonyl group) and 3511,17 (hydroxyl group).

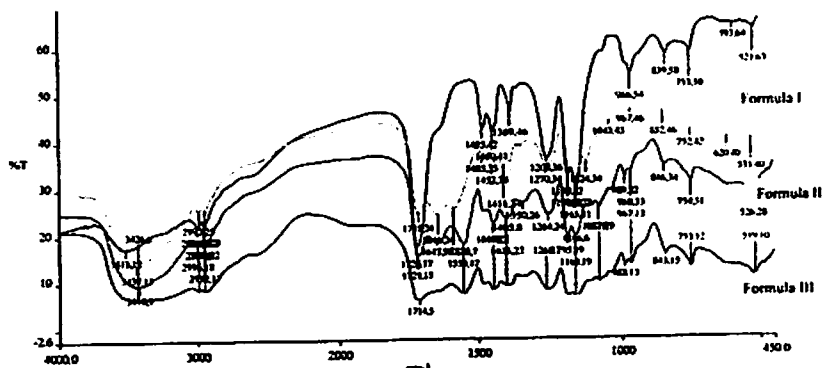


Figure 2. Fourier transforms infrared overlay spectra of L-type methacrylic acid copolymers and microparticles F1 (0.50%), F2 (0.75%), F3 (0.10%)

3.3. Moisture Content Determination (MC)

The moisture content (MC) of each microparticle formula can be seen in Table 1. The data (Table 1) showed that increasing the polymer concentration will decrease the moisture content. The highest MC was found in formula 1. The lower Formula 2 and the lowest MC were formula 3, ie 7.45 ± 0.11 %. The data were statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey honest significant difference test.

Table 1: Result of The Moisture Content (MC) (%) of The Microparticles Probiotic *Lactobacillus casei* Using L-type methacrylic acid copolymer as an matrices (n=3; p=0.05)

Formula	Replication			MC (%)
	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
I	10.58	9.98	9.98	10.05 ± 0.49
II	9.58	9.78	9.96	9.77 ± 0.19
III	7.39	7.39	7.58	7.45 ± 0.11

3.4. Encapsulation Efficiency Determination

Encapsulation efficiency was calculated from actual *Lactobacillus casei* FNCC 0090 loading. The encapsulation efficiency bacteria into polymer by spray drying process was influenced by the time taken for evaporating the water from the droplet, to solidify the matrices, and finally to dry. The result of encapsulation efficiency determination was presented in **Table 2**. The data showed that the lowest encapsulation efficiency found in formula 1 (0,05% matrices) and the highest encapsulation efficiency in formula 3 (1,00% matrices). This indicate that increasing the concentration of matrices increased the bacteria encapsulation. In fact, the formula 3 produces microparticles with encapsulation efficiency 92,46%. The data were statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey honest significant difference test.

Table 2: Encapsulation Efficiency (%) of Microparticles *Lactobacillus casei* Microparticles Using L-type methacrylic acid copolymer 0.50%; 0.75%, and 1.00% (n=3 ; p=0.05)

Formula	Bacteria biomass in the bacteria suspension (before spray drying process) (mg)	Bacteria biomass after spray in the microparticles drying process (mg)	Efficiency Encapsulation (%)	The Average of Efficiency Encapsulation (%)
1	1.162	0.297	25.56	26.33 ± 1.33
	1.162	0.297	25.56	
	1.166	0.325	27.87	
2	0.943	0.634	67.23	63.39 ± 4.53
	0.942	0.550	58.39	
	0939	0.606	64.54	
3	0.806	0.746	92.31	92.46 ± 0.17
	0.805	0.744	92.42	
	0.803	0.744	92.65	

3.5. The Viability of *Lactobacillus casei* FNCC 0090 after spray drying process

The result of this test are was presented in **Table 3** below. The data shows that the higher the .matrix concentration the greater the viability of *Lactobacillus casei* FNCC 0090 . Formula 1 (using 0.05% matrices) produced microparticles with lowest viability, that is 67.22 % ±3,40 while formula 3 (using 1,00% matrices) result the highest viability, that is 72,48 % ± 4,24. The data were statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey honest significant difference test.

Table 3: The viability (%) of *Lactobacillus casei* after spray drying process in the microparticles using L-type methacrylic acid copolymer (n=3; p=0.05)

Formula	% Viability (Replicate 1)	% Viability (Replicate 2)	% Viability (Replicate 3)	The Average of % Viability
I	63.30	69.28	69.09	67.22% ± 3.40
II	62.77	74.16	68.22	68.38% ± 5.70
III	7657	72.78	68.10	72.48% ± 4.24

4. Discussion

4.1. Microparticles Morphological examination

From these observations it can be seen that the microparticles produced from each of the formula generally have a not spherical shape with a slightly concave surface. Many of them are hollow particles and irregular particles. From the data it can be stated that the microparticles morphology reveal the copolymer matrices used in formula. The increase of L-type methacrylic acid copolymer result microparticles with better morphology: the surface more smooth and decrease the hollow. It can be explained that high concentration of the methacrylic acid copolymer will strengthen the matrices structure because the hydrogen bond increase.

4.2. FT-IR Investigation

The three formulas have decreased the wavelength number of the C=O and -OH groups compared with the L-type methacrylic acid copolymer. The vibration frequency of carboxyl group (CO) and hydroxyl group (OH) moves from 1,724,17 to 1,714,50 -1,721,150 cm^{-1} and 3.511.17 to 3,418,90 - 3,437,13 cm^{-1} , respectively.

The decreased of wave number indicating the formation of intramolecular hydrogen bonds

4.3. Moisture Content Determination (MC)

From the above data it is indicated that the concentration of the copolymer influence the moisture content of microparticles. The data shows that the minimal moisture content was in formula 3 (1,0% Copolymers). This is because increasing the concentration of the copolymer will increase the viscosity and decrease the amount of water, so the water retained in the microparticles is reduced. The data were analyzed statistically, and the result showed that there are significant differences between moisture content of microparticles formula 1, formula 2, and formula 3. It can be concluded that the concentration of L-type methacrylic acid significantly influence the moisture content of microparticles.

4.4. Encapsulation Efficiency Determination

The data showed that the concentration of polymer significantly influenced the encapsulation efficiency. From the statistically analysis, it can be concluded that there are significant differences between encapsulation efficiency of formula 1, formula 2, and formula 3. The result indicating that the concentration of copolymer significantly influence the encapsulation efficiency. The higher the concentration will result in faster polymer solidification and limit the bacteria diffusion across the phase boundary. This will increase the encapsulation efficiency of the bacteria into the polymer.

4.5. The Viability of *Lactobacillus casei* FNCC 0090 after spray drying process

The result given in Table 3, may be summarized briefly by stating that nearly 60% - 70% of the *Lactobacillus casei* survived after spray drying process. It is likely that bacteria in the suspension extensively dehydrated with a drying chamber temperature. The data were analyzed statistically. It can be concluded that there are significant differences between the viability of formula 1, formula 2, and formula 3.

The data showed that increasing the concentration of copolymer, increase the viability of bacteria. The highest viability found in formula 3 which is using 1% copolymer. It can be explained that increasing the concentration of copolymer will increase the formation of hydrogen bond. As the result, the integrity of copolymer will increase and reduced the contact of bacteria and hot air in the chamber of spray dryer.

5. Conclusion

Physical characteristic of *Lactobacillus casei* FNCC 0090 microparticles can be influenced by the concentration of L-type methacrylic acid copolymer. Increasing the L-type copolymers

concentration improve particle sizes, moisture content, encapsulation efficiency, and bacterial viability. The microparticles morphology shape and surface morphology, were improved as the concentration of L-type copolymer were increased.

Reference

- Attwood D and Florence TA. *Physical Pharmacy*. London Pharmaceutical Press, 2008, pp. 345-67
- Benita S and Tamilvanan S. Lipid and polymeric colloidal carries for ocular drug delivery. In: Benita S. (Eds). *Microencapsulation Methods and Industrial Applications*. 2nd ed. London Taylor & Francis Group, London, 2006, pp. 563-80
- Binder HW and Zirbs R. Supermolecular polymers and network with hydrogen bonds in the main and side chain.. In: Binder W (Eds). *Hydrogen Bonded Polymers*. Heidelberg, Berlin, 2007, pp. 102-105
- Corcoran BM, Stanton C, Filtered CGF, Ross RP. Survival of probiotic *Lactobacillus* in acidic environments is enhanced the presnce of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 2005: 3001-67
- Desmond C, Ross RP, Callaghan EO, Fitzgerald G, Stanton C, 2002. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray dried powders containing gum acacia, *Journal of Applied Microbiology* 93, 2002 : 1003-11
- Gil ES, Hudson SM, Stimuli-Responsive Polymers and Their Bioconjugates. *Progress in Polymer Science*. 2004. 29: 1173-1222
citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1029.3249&rep=rep1.
- Grainger SJ, El Sayed MEH. Stimuli-Sensitive Particles for Drug Delivery . In *Biologically-Responsive Hybrid Biomaterials: A Reference for Material Scientists and Bioengineers*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2010, pp. 171-190
- Heller KJ, Probiotic bacteria in fermented foods : product characteristics and starter organism. *American Journal Clinical Nutrition*, 2001; 73 (2 Supl): 374-79
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157344>
- Krasaekpoot W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotic for yoghurt. *International Dairy Journal*. 2003; 13, (1): 3-13
- Marechal Y. Hydrogen bond and the water molecule. In: Marechal Y.(Ed) *The physic and chemistry of water, aqueous and biomedica*. 1st ed. LippincotWilliam and Wilkins, Philadelphia. 2007.
- Mc Ginity JW, Felton LA. *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms* 3rd edition. Pharmaceutical Tech. Inc., USA 2008.

- Meng XC, Stanton C, Fitzgerald GF, Daly C, Ross RP. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistr*, 2008; 106 : 1406-16
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3989054/>
- Mishra B, Sankar C, Mishra M. Polymer based solutions of bupranolol hydrochloride for intranasal systemic delivery. *Journal of Drug Target*. 2011; 19: 204–211.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4612898/>
- Molema G. Drug targetting basic concepts and novel advances. In: Molema G, Meijer DKF. (Eds). *Drug targetting Organ Specific Strategies*. Weinhem: Wiley – VCH, 2001, pp. 1-9
- Nguyen DA, Fogler HS. Facilitated diffusion in the dissolution of carboxylic polymers, *American Institute of Chemical Engineers Journal*. 2005: 51 (2) : 415-425
<https://pdfs.semanticscholar.org/8405/9b7e9a26a143195e3ccd2f6855fe77011018.pdf>
- Rajpurohit H, Sharma P, Shama S, Bandhari A. Polymers for colon targeted drug delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010; 72 (6): 689-96
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3178968/>
- Sugiyartono, Purwanti T, Isnaeni Resso D. Influence of emcompress concentration on the physical properties of tablet containing *Lactobacillus acidophilus* spp and guava leave extract. *Asian J Pharm Res*. 2014;4 (4) : 189-194
asianjpr.com/AbstractView.aspx?PID=2014-4-4-5
- Teanpaisan R, Chooruk A, Wannun A, Wichienhot S, Piwat S. Survival Rates of Human-Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* SD1 in Milk Powder Using Spray Drying. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 2012; 34(3) : 241-245
rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/34-3/0241-3345-34-3-241-245.pdf
- Touhy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*. 2003; 8 (15) : 692-700
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927512>



Certificate

is awarded to:

Sugiyartono

as Oral Presenter with topic entitled

*The effect of L type methacrylic acid copolymer content on
the physical characteristics of Lactobacillus casei
microparticles*

**International Conference on
Applied Pharmaceutical Sciences 2018**

Surabaya, Indonesia, October 18-19th, 2018

SK SKP:
023/SK-SKP/PP.IA1/VII/2018

Presenter : 3 SKP



Dr. Umi Athiyah, M.S., Apt.
Dean of Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga



Andang Miatmoko, Ph.D., Apt.
Chairman



Certificate

is awarded to:

Rebhika Lusiana

as Oral Presenter with topic entitled

*Viability test of Lactobacillus casei FNCC 0090 in
microparticle with L-type methacrilic acid copolymer and
HPMC K4M matrix*

**International Conference on
Applied Pharmaceutical Sciences 2018**

Surabaya, Indonesia, October 18-19th, 2018

SK SKP:
023/SK-SKP/PP/IAI/VII/2018

Presenter : 3 SKP



Dr. Umi Athiyah, M.S., Apt.
Dean of Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga



Andang Miatmoko, Ph.D., Apt.
Chairman

