

OPTIMASI MIKROSFER OVALBUMIN-ALGINAT YANG

DIPRODUKSI DENGAN TEKNIK AEROSOLISASI

Dewi Melani Hariyadi^{a*}, Esti Hendradi^a, Octavia Librayanti Vierdina Piay^a,

Chandra Nourmasari Ramadani^a

^a Departemen Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga

Jl. Dharmawangsa Dalam Selatan, Surabaya 60286

*Corresponding author: dewiffua96@yahoo.com

ABSTRACT

The research aim was to investigate preparation and characterisation of ovalbumin-loaded alginate microspheres produced by aerosolisation and study its in vitro release. Calcium chloride was use as crosslinking agent with crosslinking time of 30 and 120 minutes. Aerosolization technique offers a simple, fast, produce homogenous microspheres and a safe technique with no organic solvent involved. Ovalbuin-loaded-alginate microspheres were evaluated in terms of size, morphology, encapsulation efficiency, loadings of protein and yield of microspheres. In vitro release study was conducetd in simulated gastric fluid (HCl pH 1.2) and simulated intestinal fluid (PBS pH 7.4). Results showed that smaller particle size (12-23 μm) and higher encapsulation efficiency, loading and yield was produced by inceasing alginate and crosslinker concentration as well as increasing crosslinking time from 30 minutes to 120 minutes. Furthermore, by increasing alginate concentration and crosslinking time, release of ovalbumin from alginate microspheres decreased and slower in pH 1,2 during 2 hours incubation followed by 6 hours incubation in PBS pH 7,4. These findings indicated its potential for oral protein delivery system.

Keywords:Alginate microspheres, Ovalbumin, Crosslinking time, Aerosolization, Release.

ABSTRAK

Pada penelitian ini telah dilakukan formulasi alginat mikrosfer sebagai pembawa model vaksin antigen ovalbumin dengan penyambung silang CaCl_2 serta perbedaan waktu sambung silang dengan metode enkapsulasi aerosolisasi untuk tujuan penggunaan oral. Pembuatan mikrosfer dengan metode gelasi ionotropik teknik aerosolisasi memiliki keuntungan dapat mempertahankan integritas protein yang akan dijebak di dalam mikrosfer. Hal ini terjadi karena protein diproses tanpa menggunakan pelarut organik ataupun panas tinggi yang dapat menyebabkan denaturasi protein. Metode ini juga dikenal efektif, sederhana, dan efektif biaya. Selanjutnya mikrosfer dikarakterisasi secara fisik dari ukuran, bentuk dan penampakan, efisiensi enkapsulasi, kandungan ovalbumin serta jumlah ovalbumin yang lepas dari alginat mikrosfer. Hasil yang diperoleh adalah mikrosfer yang diproduksi dengan waktu sambung silang 120 menit menghasilkan efisiensi penjebakan tinggi serta kandungan ovalbumin dan yield yang tinggi. Selain itu, mikrosfer yang dihasilkan memiliki bentuk yang sferis dan hampir halus dengan ukuran partikel yang kecil (12-23 μm) yang memenuhi persyaratan ukuran partikel untuk sistem penghantaran oral. Sedangkan untuk mikrosfer yang diproduksi dengan waktu sambung silang 30 menit dapat menghasilkan

mikrosfer yang sferis, namun ukurannya masih cenderung lebih besar (16-36 μ m). Peningkatan kadar alginat polimer dan konsentrasi CaCl₂ dengan waktu sambung silang 120 menit menghasilkan peningkatan kandungan ovalbumin, efisiensi pengebakan, yield dan pelepasan ovalbumin lebih lambat.

Kata Kunci: Mikrosfer Alginat, Ovalbumin, Waktu sambung silang, Aerosolisasi, Pelepasan

PENDAHULUAN

Penggunaan vaksin peroral dibandingkan rute konvensional parenteral memiliki kelebihan yaitu cara pemakaian mudah sehingga tidak memerlukan tenaga ahli dan berkurangnya efek samping yang timbul (Benoit et al, 1999). Usaha mempertahankan stabilitas antigen dalam penggunaan vaksin secara oral merupakan permasalahan yang masih terus dipelajari. Rute vaksinasi parenteral banyak digunakan 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). Contoh mikroenkapsulasi vaksin antigen maupun protein antara lain mikrosfer insulin untuk sediaan oral dengan penyalut natrium alginat dan kitosan (Istiyani, 2008), enkapsulasi antigen virus influenza (Santiago et al, 1993), dan enkapsulasi ¹³¹I-BSA menggunakan gelatin (Mladenovka et al, 2003). Ovalbumin merupakan protein globular (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).

Mikrosfer berfungsi sebagai sistem penghantaran antigen yang ampuh untuk antigen yang telah dipecah, 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. Ionotropic gelation dengan teknik aerosolisasi dilakukan dengan cara menyemprotkan larutan polimer pada larutan sambung silang hingga terbentuk mikrosfer tanpa adanya keterlibatan pelarut organik. Teknik aerosolisasi ini dapat mengenkapsulasi obat agar terlindungi dari lingkungan, prosesnya mudah dan cepat, biaya relatif murah (Yeo et al, 2001).

Na alginat merupakan polimer yang paling luas digunakan sebagai polimer pada mikropartikel (L-limos et. al., 2003). Na alginat adalah polimer alam yang non toksik, biokompatibilitas dan relatif murah (Dragnet and Tailor, 2011). Penambahan kation divalen menyebabkan terjadinya sambung silang terhadap polimer dan membentuk gel (Coradin and Livage, 2003). Ca²⁺ adalah ion yang paling sering digunakan karena non-toksik (Patil et al, 2010) dan banyak digunakan dalam penghantaran obat (Malmsten, 2002). Selain itu CaCl₂ mudah disambungkan dengan Na alginat karena ion Ca terikat pada residu asam guluronat yang merupakan komponen Na alginat. Faktor-faktor seperti konsentrasi polimer, konsentrasi penyambung silang dan waktu kontak polimer dalam formulasi mikrosfer berbasis alginat berpengaruh terhadap karakteristik dan pelepasan protein ovalbumin. Penelitian ini dilakukan untuk mengoptimasi alginat mikrosfer dengan model vaksin antigen ovalbumin dengan mengoptimasi faktor-faktor yang berpengaruh dalam pembentukan mikrosfer dengan menggunakan metode

aerosolisasi yang diharapkan bermanfaat untuk pengembangan sediaan vaksin oral.

METODE PENELITIAN

Bahan

Ovalbumin *pharmaceutical grade* (Sigma-Aldrich Inc.); Natrium alginat *pharmaceutical grade* dan BaCl₂ *pharmaceutical grade* (Sigma-Aldrich Inc.); CaCl₂.2H₂O *pharmaceutical grade* (Solvay Chemicals International); Natrium sitrat *pharmaceutical grade* (Weifang Ensign Industry Co. Ltd.); Na₂HPO₄ *pro analisis* (Merck); KH₂PO₄ *pro analisis* (Merck); NaCl *pro analisis* (Merck); HCl *pro analisis* (Merck); NaOH *pro analisis* (Merck); *Protein Quantification Kit* (Sigma-Aldrich Inc.); Aquadest.

Pembuatan Mikrosfer Ovalbumin Alginat menggunakan Teknik 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 CaCl₂ (0.1; 0.25; 0.5; 1.5M) menggunakan *spray aerosol*. Kemudian dilakukan pengadukan selama 30 menit atau 120 menit pada kecepatan 1000 rpm. Mikrosfer yang terbentuk dikumpulkan dan dicuci dari larutan sambung silang dengan aquadest kemudian dicuci dengan aquadest lagi lalu dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 2500rpm selama 6 menit. Suspensi mikrosfer kemudian dikeringkan dengan freeze dryer pada suhu -80 °C selama 20 jam.

Evaluasi Ukuran Mikrosfer Ovalbumin – Alginat

Penentuan distribusi ukuran mikrosfer dilakukan dengan menggunakan mikroskop optik.

Bentuk dan Permukaan Mikrosfer

Pengamatan bentuk dan permukaan dari mikrosfer ovalbumin dilakukan

menggunakan mikroskop optik, setelah itu dilanjutkan dengan pengamatan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

Kandungan Protein dalam Mikrosfer

Diambil 400 mg mikrosfer lalu ditambahkan 50 ml larutan Na Sitrat 0,5 M. Campuran mikrosfer dan Na Sitrat diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada kecepatan 1000 rpm selama 12 jam. Diambil 50 µl larutan sampel dan ditambahkan 2,5 ml larutan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) dalam tabung uji, lalu dikocok ad homogen. Diamati absorbansi larutan sampel dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Kadar ovalbumin ditentukan dengan memasukkan harga absorbansi sampel ke persamaan kurva baku ovalbumin yang telah dibuat.

Efisiensi Penjebakan

Efisiensi penjebakan dihitung dari hasil evaluasi kandungan ovalbumin dalam mikrosfer dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Efisiensi Penjebakan} = \frac{\text{Kandungan protein terukur}}{\text{Kandungan protein teoritis}} \times 100 \%$$

Perolehan Kembali (Yield)

Yield mikrosfer dihitung dari jumlah total mikrosfer kering yang diperoleh dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Yield} = \frac{\text{Berat total mikrosfer kering}}{\text{Berat alginat} + \text{Berat ovalbumin}} \times 100 \%$$

Profil Pelepasan Ovalbumin dari Mikrosfer

Pelepasan ovalbumin dari mikrosfer dilakukan pada larutan HCl pH 1,2 kemudian *diadjust* menggunakan komponen dapar fosfat salin sampai pH 7,4. Uji profil pelepasan dilakukan dengan menggunakan Thermoshaker pada suhu 37°C pada kecepatan 100 rpm. Ditimbang sejumlah mikrosfer yang setara dengan 400 mg ovalbumin. Sampel dimasukkan 100 ml larutan HCl pH 1,2 pada thermoshaker yang telah mencapai suhu 37 ± 0,5°C dan diputar dengan kecepatan 100 rpm. Diambil cuplikan sampel (5,0 ml)

pada menit ke- 0, 60 dan 120. Pada setiap pengambilan cuplikan sampel dilakukan penggantian media pelepasan dengan larutan HCl pH $1,2 \pm 0,05$ sebanyak 5,0 ml. Setelah dilakukan sampling pada menit ke-120 ditambahkan 1,4990 g KH_2PO_4 dan 10,5969 g Na_2HPO_4 ke dalam sampel kemudian diadjust sampai pH 7,4 menggunakan 2 ml NaOH. Diambil cuplikan sampel setelah pH mencapai 7,4 yaitu pada menit ke-130, 250 dan 370. Pada setiap pengambilan cuplikan sampel dilakukan penggantian media pelepasan dengan media yang sama. Cuplikan sampel disaring menggunakan kertas saring milipore 0,45 μm . Diambil 50 μl larutan sampel dan ditambahkan 2,5 ml larutan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) dalam tabung uji, lalu dikocok ad homogen. Diamati absorbansi sampel dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang

Tabel 1. Ukuran Partikel Mikrosfer Ovalbumin-Alginat

CaCl ₂ (M)	Diameter rata-rata (µm)					
	Waktu sambung silang 30 menit			Waktu sambung silang 120 menit		
	Konsentrasi Alginat (%)					
	1	1.5	2.5	1	1.5	2.5
1.5	15.50	15.66	25.48	12.30	12.54	17.13
0.5	20.16	21.35	30.73	18.00	18.06	21.14
0.25	28.45	30.85	33.16	19.30	20.24	22.50
0.1	Tdk terbentuk	Tdk terbentuk	35.30	Tdk terbentuk	Tdk terbentuk	23.10

Berdasarkan hasil yang didapatkan diketahui bahwa mikrosfer yang dihasilkan memiliki diameter partikel antara 15.50 μm hingga 35.3 μm (Tabel 1) untuk mikrosfer yang diproduksi dengan waktu sambung silang 30 menit, sedangkan peningkatan waktu sambung silang hingga 120 menit menghasilkan mikrosfer dengan ukuran yang lebih kecil yaitu antara 12.30 μm hingga 23.10 μm . Hal ini kemungkinan disebabkan karena mikrosfer mengalami penyusutan (Manjanna *et al*, 2010). Diameter rata-rata mikrosfer yang dihasilkan pada formula dengan konsentrasi alginat yang besar, ukurannya juga lebih besar. Peningkatan kadar alginat

gelombang 600 nm. Kadar ovalbumin ditentukan dengan memasukkan harga absorbansi sampel ke persamaan kurva baku ovalbumin yang telah dibuat sebelumnya.

Analisa Data

Kandungan protein, efisiensi penjebaran dan yield dianalisis secara statistik menggunakan metode *Independent Sample T-Test*. Profil pelepasan ovalbumin dianalisa menggunakan statistik dengan metode *One Way ANOVA* dengan derajat kepercayaan penelitian 95% ($\alpha = 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pemeriksaan Distribusi Ukuran Mikrosfer

Hasil pemeriksaan distribusi ukuran mikrosfer dapat dilihat pada tabel 1

diikuti dengan peningkatan diameter mikrosfer disebabkan karena meningkatnya viskositas larutan alginat yang digunakan sehingga terbentuk droplet alginat yang besar selama penambahan larutan alginat ke dalam larutan penyambung silang dan menyebabkan mikrosfer yang dihasilkan menjadi lebih besar (Manjanna *et al*, 2010).

Hasil Pemeriksaan Bentuk dan Permukaan Mikrosfer

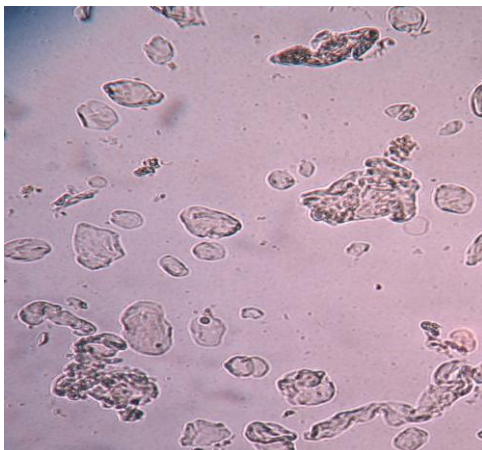
Setelah dilakukan pengukuran diameter mikrosfer, selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap bentuk mikrosfer menggunakan mikroskop optik dengan

perbesaran 400x (Gambar 1). Dari hasil pengamatan diketahui bahwa mikrosfer dengan kadar alginat 2,5% memiliki bentuk yang lebih spheris dibanding mikrosfer dengan kadar alginat 1,5%. Hal yang menarik lainnya adalah pada formula yang menggunakan larutan sambung silang konsentrasi rendah (0.1M), tidak terbentuk mikrosfer, melainkan hanya berupa benang panjang seperti pada gambar 2 pada mikrosfer formula D.

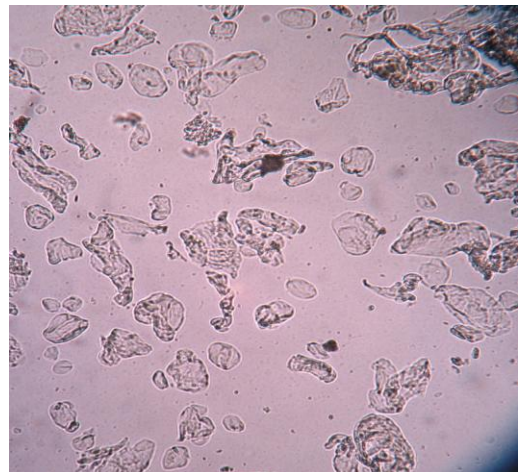
Setelah itu dilakukan pengamatan bentuk mikrosfer lebih lanjut menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) pada mikrosfer dengan kadar alginat 1,5 dan 2,5% serta konsentrasi CaCl_2 yang tinggi (1,5M), hasil SEM menunjukkan bahwa mikrosfer yang dihasilkan berbentuk spheris dan memiliki permukaan yang hampir rata

halus, sedangkan untuk mikrosfer dengan kadar CaCl_2 rendah (0,25-0,5M) permukaannya tidak rata (Gambar 2). SEM juga menunjukkan morfologi gumpalan benang panjang pada formula D. Fenomena permukaan mikrosfer yang secara umum kurang halus dan rata ini kemungkinan disebabkan karena viskositas polimer yang terlalu rendah dapat mengakibatkan kekuatan sambung silang pembentukan struktur mikrosfer kurang kuat sehingga mudah mengekerut dan tidak rata. Selain itu pengkerutan mikrosfer juga dapat dimungkinkan akibat proses pendinginan dan pengeringan yang terjadi selama proses *freeze drying*.

Hasil pemeriksaan bentuk dan permukaan mikrosfer dapat dilihat pada gambar 1 dan 2 berikut ini:



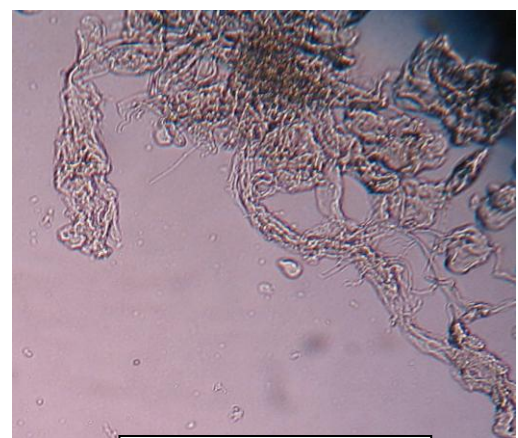
A: 2.5% alg 1.5M 30 menit



B: 1.5% alg 1.5M 2 jam

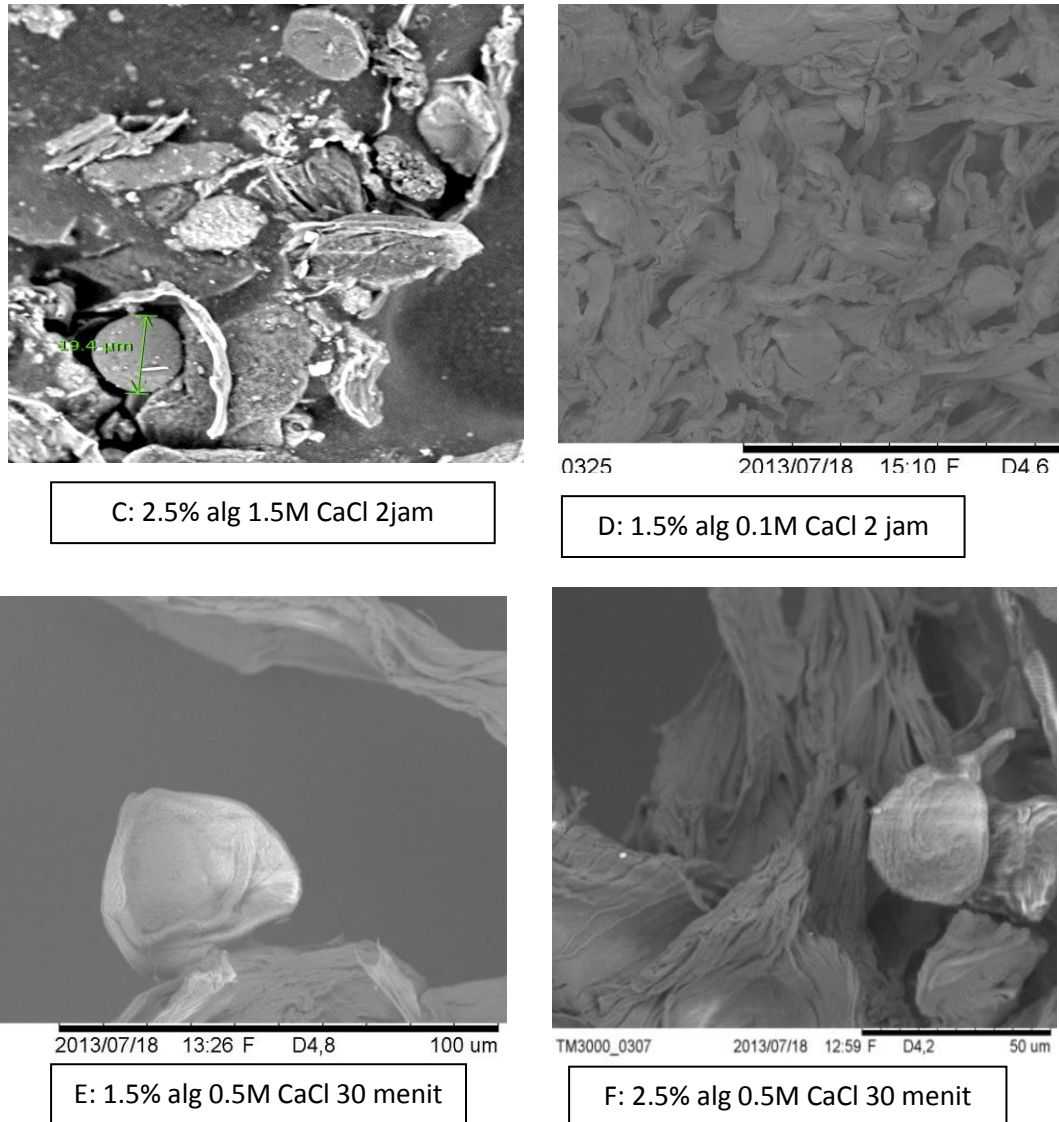


C: 2.5% alg 1.5M 2 jam



D: 1.5% alg 0.1M 2 jam

Gambar 1. Hasil pemeriksaan bentuk dari mikrosfer ovalbumin-alginat menggunakan mikroskop optik dengan perbesaran 400x



Gambar 2 Hasil pemeriksaan bentuk dari mikrosfer ovalbumin-alginat menggunakan *Scanning Electron Microscope*

Hasil Pemeriksaan Efisiensi penjebakan

Hasil Pemeriksaan Efisiensi Penjebakan Ovalbumin dalam Mikrosfer dapat dilihat pada tabel 2. Pada pemeriksaan efisiensi penjebakan protein diperoleh data efisiensi penjebakan meningkat bermakna seiring dengan meningkatnya kadar alginat yang digunakan dari 1% menjadi 2.5% (Tabel 2), terlihat dari nilai t_{hitung} dari hasil uji t -test yang lebih besar dari t_{tabel} . Peningkatan kadar alginat yang digunakan

dalam pembuatan mikrosfer menyebabkan meningkatnya jumlah bahan sambung silang yang berikatan dengan rantai polimer sehingga jumlah protein yang terjebak meningkat (Manjanna *et al*, 2010). Efisiensi enkapsulasi ovalbumin dalam mikrosfer mencapai hampir 90% menunjukkan indikasi bahwa mikrosfer ovalbumin-alginat yang diproduksi dengan teknik aerosolisasi ini sangat potensial.

Tabel 2. Efisiensi penjebakan Ovalbumin dalam Mikrosfer

CaCl ₂ (M)	Efisiensi Penjebakan (%)					
	Waktu sambung silang 30 menit			Waktu sambung silang 120 menit		
	Konsentrasi Alginat (%)					
	1	1.5	2.5	1	1.5	2.5
1.5	31.80 ± 4.20	64,07 ± 3,17	89.20 ± 6.50	30.84 ± 0.60	63.75 ± 4.33	88.80 ± 0.52
0.5	23.35± 2.55	40,24 ± 6,20	67,67 ±10,55	22.51 ± 2.26	38.31 ± 8.38	67.18 ± 8,03
0.25	6.30± 1.56	6.38 ± 2.20	59.08± 5.35	6.22 ± 0.20	5.04 ± 0.68	58.24 ± 2.35
0.1	-	-	50.12 ± 4.08	-	-	49.42 ± 8.22

Pada pemeriksaan dengan perbedaan waktu sambung silang menunjukkan sedikit penurunan yang tidak bermakna dari analisa statistiknya, sehingga peningkatan waktu kontak sambung silang (dari 30 menit ke 120 menit) tidak memberikan pengaruh terhadap efisiensi penjebakan protein, hal ini disebabkan karena mikrosfer yang terbentuk memiliki

porositas yang cukup sehingga dapat mencegah protein yang terjebak larut kembali dalam air.

Hasil Pemeriksaan Kandungan Ovalbumin

Hasil Pemeriksaan Kandungan Ovalbumin dalam Mikrosfer dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Kandungan Ovalbumin dalam Mikrosfer

CaCl ₂ (M)	Kandungan Protein (%)					
	Waktu sambung silang 30 menit			Waktu sambung silang 120 menit		
	Konsentrasi Alginat (%)					
	1	1.5	2.5	1	1.5	2.5
1.5	40.36 ± 2.92	64.96 ± 2.92	75,81 ± 1,72	36.00 ± 0.35	64.22± 8.82	74.50 ± 1.70
0.5	20,45 ± 4.44	22.98 ± 2.84	71,81 ± 1,73	18.76 ± 0.20	20.60 ± 5.78	70,10 ± 9.93
0.25	20.14 ± 1,45	21.14 ± 1.52	69.90 ± 2.07	18.12 ± 1.06	19.10 ± 2.20	68.73 ± 2.50
0.1	-	-	50.24 ± 0.90	-	-	49.58 ± 3.11

Dari hasil pemeriksaan kandungan protein, diketahui kandungan ovalbumin pada mikrosfer yang diproduksi dengan sambung silang 30 menit adalah antara 20.14% hingga 75.81%, sedangkan kandungan ovalbumin dari mikrosfer yang diproduksi dengan waktu sambung silang 120 menit adalah lebih rendah sekitar 18.12% hingga 74.50%.

Pada formula dengan kadar alginat 2.5%, kandungan ovalbumin lebih besar dibandingkan dengan mikrosfer dengan kadar alginat lebih rendah yaitu 1 dan 1,5% untuk semua formula dengan waktu

sambung silang 30 menit maupun 120 menit (Tabel 3). Hasil analisa statistik menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara formula dengan peningkatan kadar alginat meningkatkan kandungan ovalbumin. Peningkatan kandungan protein dalam mikrosfer pada formula dengan kadar alginat yang lebih besar dapat disebabkan karena peningkatan kadar polimer menyebabkan meningkatnya jumlah bahan penyambung silang yang dapat berikatan dengan rantai polimer sehingga dapat meningkatkan kandungan protein dalam mikrosfer (Manjanna *et al*,

2010). Selain itu, mikrosfer yang terbentuk dengan kadar alginat yang tinggi cenderung mengalami penurunan porositas sehingga lebih kompak dan dapat mencegah ovalbumin yang terjebak terlepas kembali. Namun hasil pemeriksaan pada formula dengan waktu kontak sambung silang 30 menit maupun 120 menit tidak menunjukkan adanya pengaruh perbedaan kadar polimer terhadap kandungan protein dalam mikrosfer yang ditunjukkan dengan nilai t_{hitung} yang lebih kecil dari nilai t_{tabel} . Kandungan protein yang diperoleh mengalami penurunan seiring dengan

meningkatnya waktu kontak sambung silang yang digunakan, dapat disebabkan karena mikrosfer yang terbentuk memiliki porositas yang lebih besar (Manjanna *et al*, 2010) dan memiliki laju *swelling* yang lebih tinggi (Joshi *et al*, 2012) sehingga dapat menyebabkan ovalbumin terlepas kembali apabila direndam terlalu lama.

Hasil Pemeriksaan Perolehan Kembali (yield)

Hasil pemeriksaan yield dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Pemeriksaan yield mikrosfer

CaCl ₂ (M)	Yield (%)					
	Waktu sambung silang 30 menit			Waktu sambung silang 120 menit		
	Konsentrasi Alginat (%)					
	1	1.5	2.5	1	1.5	2.5
1.5	44.56± 3.08	47.78 ± 2.33	68.20 ± 5.43	61.18± 3.26	62.30 ± 3.90	75.29 ± 8.56
0.5	19.90 ± 5.70	28.90 ± 3.80	44.58 ± 2.38	23.38 ± 0.13	33.56 ± 2.62	51.84 ± 6,29
0.25	13.60 ± 2.08	26.89 ± 3.21	37.67 ± 2.55	22.53 ± 2.86	33.60 ± 3.44	42.37 ± 2.26
0.1	-	-	30.70 ± 3.58	-	-	42.32 ± 7.28

Langkah selanjutnya adalah penentuan yield mikrosfer, dari hasil penelitian yang dilakukan diperoleh yield formula yang terbesar adalah sekitar 76% pada formula menggunakan alginat kadar 2.5%, CaCl₂ kadar 1.5M dan waktu sambung silang 120 menit. Tabel 4 menunjukkan bahwa peningkatan kadar alginat yang digunakan (1% ke 2.5%) menyebabkan % yield mikrosfer meningkat. Dari hasil uji *t-test* yang dilakukan diperoleh nilai t_{hitung} yang lebih besar dari nilai t_{tabel} , hal ini menunjukkan bahwa ada peningkatan yield yang bermakna antara formula. Fenomena yang sama untuk peningkatan kadar larutan sambung silang menyebabkan peningkatan yield mikrosfer. Sedangkan untuk waktu sambung silang yang meningkat, semua formula mikrosfer menghasilkan yield

yang lebih tinggi dan perbedaan kenaikan yield ini signifikan.

Hasil Pemeriksaan Uji Pelepasan Ovalbumin dari Mikrosfer Alginat

Uji pelepasan ovalbumin dari mikrosfer dilakukan pada formula dengan alginat 1.5% (formula 1) dan 2.5% (formula 2) serta menggunakan CaCl₂ dari formula yang terbaik. Formula mikrosfer terbaik yang akan diuji pelepasannya ditinjau dari kandungan protein, efisiensi pengebakan, dan yield adalah formula mikrosfer dengan efisiensi pengebakan dan kandungan ovalbumin tinggi serta menghasilkan mikrosfer yang berukuran kecil yang memungkinkan untuk diaplikasikan secara per oral yaitu antara 10-30µm. Dari hasil diatas, ditentukan bahwa formula mikrosfer yang diuji adalah

formula dengan kadar alginat 1.5% dan 2.5% dengan waktu sambung silang 120 menit yang telah menghasilkan efisiensi pengebakan dan kandungan ovalbumin tinggi serta menghasilkan ukuran paling kecil yaitu yang dibentuk dari alginat dengan kadar 1.5% dan 2.5%, CaCl_2 1.5 M, dan waktu sambung silang 120 menit.

Profil pelepasan menunjukkan formula mikrosfer 1 dapat melindungi ovalbumin lepas dalam suasana asam (pH 1.2.) dan mempertahankan ovalbumin sehingga dapat lepas perlahan pada PBS pH 7.4 dibandingkan dengan formula 2 yang ovalbuminnya lepas lebih cepat (80% ovalbumin lepas dalam waktu 360 menit dalam media PBS). Penyebab perbedaan pelepasan ini antara lain adanya pemaparan atau inkubasi mikrosfer pada pH asam dan kemudian pH 7,4 pada mikrosfer alginat yang memungkinkan 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 F3 (Soni *et al*, 2011). Mikrosfer menjadi rapuh atau berkembang sangat tergantung pada kadar polimernya yang dapat mempengaruhi viskositas larutan polimernya, sehingga jika terlalu viskos CaCl_2 mengalami kesulitan berpenetrasi kedalam tetesan alginat sehingga reaksi sambung silang yang terjadi kurang sempurna dan menghasilkan mikrosfer yang lebih rapuh (Tavakol *et al*, 2013).

KESIMPULAN

1. Peningkatan konsentrasi alginat dan konsentrasi sambung silang CaCl_2 menyebabkan peningkatan efisiensi pengebakan protein dalam mikrosfer, kandungan ovalbumin dan yield mikrosfer, sedangkan waktu sambung silang tidak memberikan pengaruh bermakna kecuali pada yield mikrosfer.

2. Peningkatan kadar alginat (dari 1.5 ke 2.5%) terhadap profil pelepasan ovalbumin dari mikrosfer alginat dengan kadar sambung silang 1.5M menunjukkan pelepasan ovalbumin yang lebih cepat dan jumlah ovalbumin yang lepas lebih besar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DIKTI yang telah memberikan bantuan pendanaan penelitian ini serta Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas bantuan fasilitas penelitiannya beserta pihak lain yang terkait.

DAFTAR PUSTAKA

- Benoit, M.-A., Baras, B., Gillard, J., (1999). Preparation and characterization of protein-loaded poly(o-caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. *International Journals of Pharmaceutics*, pp. 73-84.
- Coradin, T., Livage, J., 2003, Synthesis and Characterization of Alginate/Silica Biocomposites, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, Vol.26, No.1-3, pp. 1165-1168.
- Croguennec, T., Renault, A., Beaufils, S., Dubois, J., Pezenec, S., 2007, Interfacial properties of heat-treated ovalbumin, *Journal of Colloid and Interface Science*, 315(2). p. 627-636.
- Draget, K.I., Smidsred, Olav., Skjak-Braek, G., 2005. Alginate from Algae. In: Steinbuchel, A. and Rhee, S.K., *Plysaccharide and Polyamides in the Food Industry. Properties, Production, and Patents*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag Gmb H & Co. KGaA., p. 1-30.
- Istiyani, Khoirul. 2008. *Mikroenkapsulasi Insulin untuk Sediaan Oral Menggunakan Metode Emulsifikasi dengan Penyalut Natrium Alginat dan Kitosan*.

- Joshi, S., Patel, P., Lin, S. and 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*, pp. 134-142.
- Malmsten, M., 2002. *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*. New York: Macel Dekker, Inc.
- Manjanna, K.M., Kumar, T.M Pramod., Shivakumar, B. 2010. Calcium Alginate Cross-linked Polymeric Microbeads for oral sustained Drug Delivery in Arthritis. *Drug Discoveries and Therapeutic*, vol 4, no 2, pp. 109-122.
- Mladenovska, K., Janevik, E.L., Glavas, M.D., Kumbaradzi, E.F. and Goracinova, K., 2003. Biodistribution of ¹³¹I-BSA loaded gelatin microspheres after peroral application to BALB/c mice – Particle size study. *Acta Pharmaceutica*, pp. 187-197.
- 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*, pp. 239-242.
- Patil, P., Chavanke, D. and Wagh, M., 2012. A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, Vol. 4 Suppl. 4, pp. 27-32.
- Santiago, N., Milstein, S., Rivera, T., Garcia, E., Zaidi, T., Hong, H. and Bucher, D., 1993. Oral Immunization of Rats with Proteinoid Microspheres Encapsulating Influenza Virus Antigens. *Pharmaceutical Research*, vol. 10 Issue 8, pp. 1243-1247.
- Singh, I. and Kumar, P., 2012. Formulation and optimization of tramadol loaded alginate beads using response surface methodology. *Pakistan. Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 25 No. 4 pp. 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*, Vol.81. No.3. pp. 185-191.
- 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*. Vol 2 pp.64-68.
- Tavakol, M., Vashegani-Farahani, E. and Hashemi-Najafabadi, S., 2013. The Effect of Polymer and CaCl₂ Concentrations on the Sulfasalazine Release from Alginate-N,Ocarboxymethyl Chitosan Beads. *Progress in Biomaterials*. Vol. 2 pp. 10.
- Yeo, Y., Baek, N. and Park, K., (2001). Microencapsulation Methods for Delivery of Protein Drugs. *Biotechnology Bioprocessing Engineering*, vol. 6 No. 4. pp. 213-230.