

FORMULASI MIKROENKAPSULASI PROTEIN DALAM POLI(D,L-LAKTIDA) DENGAN TEKNIK PENGUAPAN PELARUT

Lili Fitriani¹, Heni Rachmawati², Tri Suciati²

¹Fakultas Farmasi Universitas Andalas, ²Sekolah Farmasi, ITB

ABSTRACT

Poly (D,L-lactide acid) has been used as scaffold and controlled release device for protein such as growth factor in tissue engineering. In this study, P_{DL}LA microparticles were made and papain was used as model protein. Protein was encapsulated in microparticles using water-oil-water (W₁/O/W₂) and solid-oil-water (S/O/W) emulsification-solvent evaporation. Types of encapsulation methods and ratios of papain-PEG 20000 were observed in this study to provide the highest encapsulation efficiency. The entrapment efficiency made by W₁/O/W₂ method was 6,38%±0,025, whilst S/O/W using ratios of papain-PEG 20000 1:1 ; 1:4 ; and 1:5 were 6,24%±0,91 ; 30,15%±1,66 and 60,67%±4,93, respectively. To conclude, S/O/W is the best method to encapsulate protein with highest entrapment efficiency.

Keywords: microencapsulation, protein, P_{DL}LA, solvent evaporation

PENDAHULUAN

Perkembangan bioteknologi saat ini telah menghasilkan banyak protein, namun sifat protein yang mudah terdegradasi baik secara kimia maupun fisika menjadi kendala dalam penghantaran protein. Oleh karena itu diperlukan sistem penghantaran yang tepat untuk mendapatkan efek yang diharapkan. Salah satu aplikasi dari penggunaan protein yaitu untuk teknik rekayasa jaringan yang merupakan konsep baru dalam pengobatan untuk mempercepat regenerasi jaringan melalui penggunaan sel, polimer sintetis dan protein seperti faktor pertumbuhan (Vacanti dan Langer, 2003).

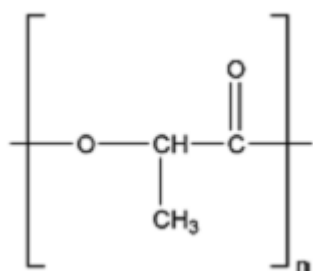
Metode penghantaran protein dapat dilakukan dengan berbagai cara diantaranya: (1) protein dapat ditambahkan secara langsung pada polimer sebelum pembuatan *scaffold* atau adsorpsi setelah pembentukan *scaffold*. Metode ini merupakan metode paling sederhana, namun kemungkinan protein terdegradasi selama proses pembentukan *scaffold* atau

terjadi pelepasan yang tidak diinginkan ketika protein dimasukkan dengan cara ini. (2) mikropartikel dibuat menggunakan teknik enkapsulasi dan bertujuan untuk penghantaran pelepasan protein yang terkendali.

Enkapsulasi protein dapat dilakukan menggunakan polimer alam ataupun polimer sintetis. Pemilihan polimer didasarkan pada tujuan enkapsulasi dan metode yang akan digunakan. Persyaratan umum untuk bahan yang digunakan dalam mikroenkapsulasi, yaitu tidak toksik, biodegradabel, tidak iritan, tidak membentuk kompleks dengan protein yang digunakan. Secara umum enkapsulasi dapat dilakukan dengan menggunakan metode fisika, kimia dan fisikokimia. Metode kimia meliputi polimerisasi antar muka, polimerisasi *in situ* dan teknik pengerasan dalam cairan. Metode fisika meliputi semprot kering dan semprot beku, suspensi udara dan penyalutan dengan panci penyalut. Metode fisikokimia dapat

dilakukan dengan koaservasi pemisahan fasa, dispersi secara peleburan dan emulsifikasi penguapan pelarut (Wise, 2000).

Poli laktida merupakan polimer sintesis yang bersifat biodegradabel dan biokompatibel yang mengalami degradasi melalui pemotongan rantai ester menjadi asam hidrokarboksilat yang bersifat tidak toksik. Penggunaan poli laktida diantaranya yaitu pembuatan mikrosfer, mikrokapsul, dan nanopartikel untuk sistem penghantaran terkontrol. Kecepatan degradasi polimer ini dipengaruhi kristalinitas, hidrofobisitas, rasio co-polimer dan bobot molekul (Rowe, 2003).



Gambar 1.1 Struktur kimia Poli Laktida

Poli laktida dibentuk melalui polimerisasi pembukaan cincin (*ring-opening polymerization*) dari dimer asam laktat menggunakan katalis dan panas. Asam laktat merupakan molekul kiral yang mempunyai stereoisomer dan menghasilkan dua isomer yaitu poli-L-laktida (P_LLA), poli-D-laktida (P_DLA) dan rasematnya poli-DL-laktida (P_{DL}LA). P_LLA mempunyai bentuk kaku, bersifat hidrofobik dan mempunyai kecepatan degradasi yang lambat sehingga aplikasi polimer ini untuk rekayasa jaringan terbatas. Suhu titik lebur P_LLA yaitu 173-178 °C dengan suhu transisi gelas 60-65 °C. P_LLA larut dalam kloroform dan metilen klorida. Fleksibilitas P_LLA dapat ditingkatkan dengan penggunaan bahan Adanya kekuatan mekanik yang berasal dari proses agitasi yang intensif dari

pemplastis. Sebaliknya P_{DL}LA merupakan polimer amorf dengan suhu transisi gelas rendah yaitu 55-60 °C yang disebabkan karena ketidakteraturan bentuk rantai polimer. Oleh karena itu P_{DL}LA dapat diproses lebih mudah dengan pemanasan, pelarut organik atau proses superkritik sehingga menghasilkan dispersi obat (zat aktif) yang lebih homogen dari dalam matrik polimer. Polimer ini telah digunakan untuk mengenkapsulasi protein menjadi mikropartikel menggunakan teknik penguapan pelarut (Castellanos, I. J., dkk., 2002).

Emulsifikasi yang disertai dengan penguapan pelarut merupakan prosedur umum enkapsulasi protein. Emulsifikasi air/minyak/air atau A₁/M/A₂ merupakan metode yang paling umum digunakan. Namun metode tersebut mempunyai beberapa kelemahan seperti aktivitas protein dapat hilang selama proses yang disebabkan karena adsorpsi protein pada interfasa air dan pelarut organik emulsi primer (A₁/M) sehingga mengakibatkan *unfolding irreversible* dan agregasi molekul protein. Untuk mengatasi masalah tersebut dapat dilakukan beberapa strategi antara lain memaksimalkan konsentrasi protein pada fasa internal (A₁) untuk memberikan perlindungan terhadap protein, meminimalisasi fraksi protein pada lapisan permukaan terdenaturasi dengan menggunakan surfaktan atau *protein carrier* seperti *bovine serum albumin* (BSA) pada emulsi primer, menambahkan gula seperti manitol dan trehalose yang dapat melindungi protein dari pengaruh pelarut organik melalui proses dehidrasi dan menambahkan pelarut semipolar seperti aseton dalam fasa air yang kemungkinan dapat mengurangi tegangan permukaan antara fasa organik dan fasa air.

larutan protein untuk emulsifikasi terutama pada emulsi primer dapat menyebabkan

ketidakstabilan protein (Suciati, T., dkk., 2004). Sedangkan emulsifikasi padat/minyak/air (P/M/A) lebih baik dibandingkan dengan teknik $A_1/M/A_2$ (Morita, T., dkk., 2000).

Pada metode ini, partikel protein disuspensikan dalam larutan polimer dalam pelarut organik anhidrat. Dengan tidak adanya air, maka proses *unfolding irreversible* dapat dicegah. Struktur asli protein dapat dipertahankan dalam suspensi ini. Masalah utama dari teknik ini yaitu efisiensi enkapsulasi protein yang rendah akibat disolusi protein pada fasa air. Hal ini dapat dicegah dengan cara liofilisasi protein menggunakan ampifilik polimer seperti PEG, PVP dan pluronic F68 yang akan larut dalam pelarut organik.

Metode dan Bahan

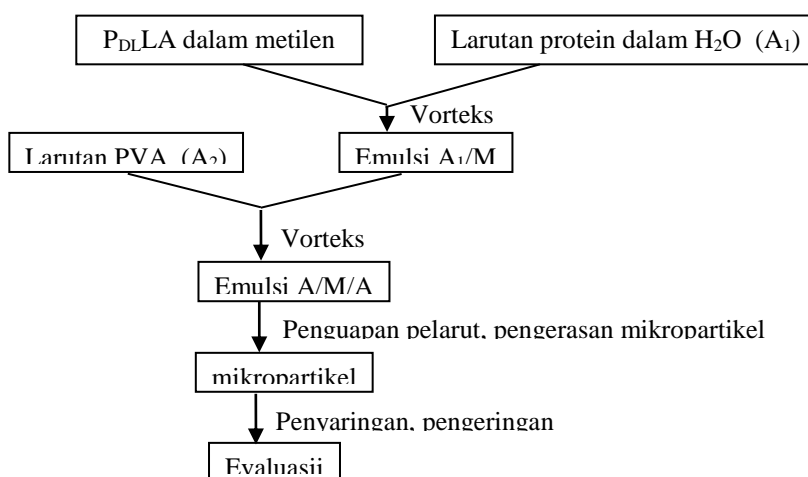
Bahan-bahan dan alat

Papain (Merck FI 286744-425), P_{DLA} (Purac, PDL 05), PEG 20000 (Fluka), PVA 88% *hydrolized* (Sigma Aldrich), tablet PBS phosphate (buffer saline) pH 7,4 (Biobasic), air suling, pereaksi Bradford (Sigma Aldrich), metilen klorida (Merck). Vorteks (IKA), spektrofotometer ultra violet – sinar tampak (Beckman DU 7500i), pH meter (Beckman Φ^{TM} 50), pengaduk magnet, tabung sentrifuga,

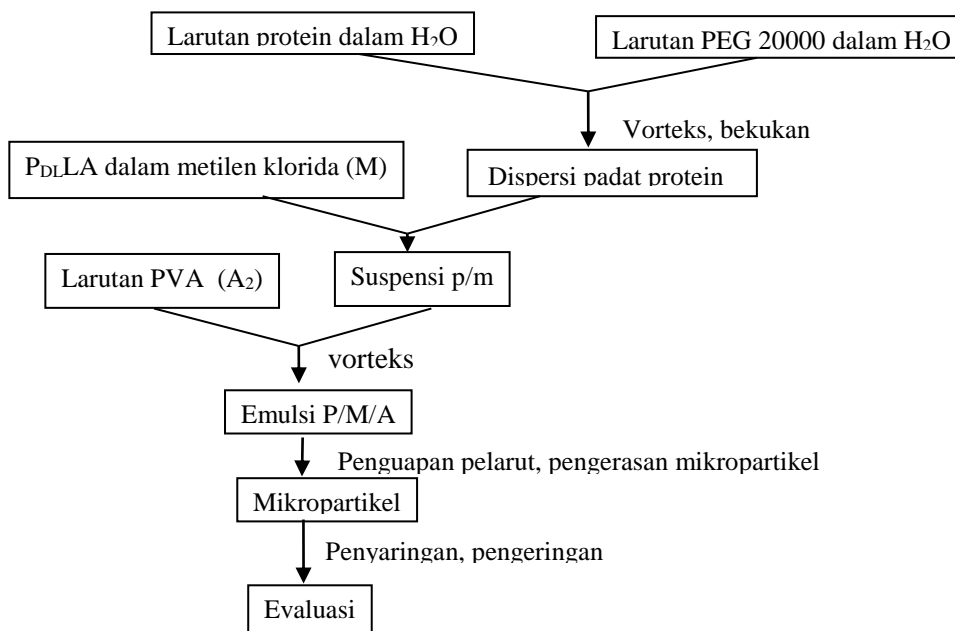
tabung mikrosentrifuga (Eppendorf), mikropipet (Bio Rad), *scanning electron microscope* (SEM) (Jeol JSM 6360 LA), Hitachi TM 1000, *freeze dryer*, sentrifuga (Hettich EBA 8S), ayakan, serta alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Persiapan

Enkapsulasi papain menggunakan dua metode emulsifikasi penguapan pelarut yaitu $A_1/M/A_2$ dan P/M/A. Proses mikroenkapsulasi papain dengan metode $A_1/M/A_2$ yaitu larutan papain merupakan fasa A_1 , P_{DLA} dalam metilen klorida bertindak sebagai fasa M, dan larutan PVA sebagai fasa A_2 , sedangkan metode P/M/A dilakukan melalui dua tahap yaitu liofilisasi protein dan enkapsulasi protein liofilisat dalam P_{DLA} . Liofilisasi protein menggunakan PEG dengan berbagai konsentrasi untuk mendapatkan protein dengan ukuran yang kecil dan selanjutnya dilakukan tahap yang sama dengan metode $A_1/M/A_2$. Evaluasi yang dilakukan yaitu efisiensi enkapsulasi dengan menghitung jumlah protein yang terdapat dalam mikropartikel dan dibandingkan dengan protein awal pada saat liofilisasi. Bagan pembuatan mikropartikel dengan emulsifikasi penguapan pelarut $A_1/M/A_2$ dan P/M/A dapat dilihat pada Gambar 2.1 dan 2.2.



Gambar 2.1 Skema metode emulsifikasi penguapan pelarut A₁/M/A₂



Gambar 2.2 Skema metode emulsifikasi penguapan pelarut P/M/A

Formula mikroenkapsulasi papain

Faktor yang diteliti yaitu teknik pembuatan mikropartikel dan rasio jumlah papain dengan PEG 20000 yang bertujuan untuk mengecilkan ukuran protein dan mencegah agregasi pada proses emulsifikasi. Formulasi mikroenkapsulasi papain dapat dilihat pada Tabel 3.3.

Evaluasi protein enkapsulasi yaitu penentuan efisiensi enkapsulasi papain

dalam mikropartikel dan morfologi mikropartikel menggunakan SEM. Penentuan efisiensi enkapsulasi dilakukan dengan menimbang sejumlah tertentu mikrokapsul berukuran 100-280 µm dilarutkan dalam 1 mL metilen klorida. Selanjutnya dicampur dengan 2 mL larutan PBS, divorteks selama 1 menit dan disentrifuga dengan kecepatan 3500 rotasi per menit. Fasa air diambil dan proses ekstraksi dilakukan berulang menggunakan larutan PBS sebanyak 2 mL dan 1 mL.

Supernatan yang diperoleh selanjutnya direaksikan dengan pereaksi Bradford dan diukur serapan pada panjang gelombang sinar tampak 593 nm. Kandungan protein yang terdapat pada mikropartikel dihitung menggunakan kurva kalibrasi papain

dengan pereaksi yang sama. Perhitungan efisiensi enkapsulasi yaitu dengan membandingkan jumlah papain yang terenkapsulasi dengan jumlah papain yang ditambahkan pada proses enkapsulasi.

Tabel 3.3 Formula mikroenkapsulasi papain

Bahan	F I	F II	F III	F IV
Jenis emulsifikasi	A ₁ /M/A ₂	P/M/A	P/M/A	P/M/A
Papain (mg)	250	10	10	10
PEG 20000 (mg)	50	10	40	50
PLA (g)	1	1	1	1
PVA 0,3% (ml)	97	97	97	97

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode pembuatan mikropartikel mengandung papain dilakukan dengan emulsifikasi penguapan pelarut A₁/M/A₂ dan P/M/A. Emulsifikasi A₁/M/A₂ memberikan hasil efisiensi enkapsulasi yang rendah dan juga menyebabkan denaturasi protein. Sebaliknya teknik P/M/A dapat melindungi protein dari proses denaturasi, ini disebabkan karena protein diliofilisasi terlebih dahulu menggunakan lioprotektan seperti PEG 20000. Dari formulasi F I diperoleh hasil efisiensi enkapsulasi mikropartikel sebesar $6,38\% \pm 0,025$. Rendahnya efisiensi enkapsulasi yang diperoleh dengan metode ini disebabkan karena protein berada dalam bentuk larutan dimana volum larutan protein yang cukup besar menyebabkan protein akan berdifusi menuju fasa luar yaitu larutan PVA. Hal ini akan menyebabkan jumlah protein yang terenkapsulasi dalam polimer menurun. Oleh karena itu dilakukan pembuatan mikroenkapsul menggunakan metode P/M/A. Untuk memperoleh efisiensi enkapsulasi yang tinggi dilakukan pengecilan ukuran protein (mikronisasi) yang akan dienkapsulasi. Mikronisasi protein dapat dilakukan menggunakan

bahan pembantu seperti PEG yang merupakan polimer ampifilik.

Proses penurunan ukuran protein dilakukan dengan melarutkan protein dalam larutan polimer ampifilik yaitu polimer yang dapat larut dalam air dan pelarut organik. Proses pengecilan ukuran dapat terjadi melalui pemisahan fasa selama proses pengeringan beku. Pada proses pembekuan larutan protein-polimer yang mengalami kondensasi dan selanjutnya akan mengalami pemisahan fasa. Perbandingan jumlah protein dan polimer sangat berpengaruh pada proses ini (Morita, T., dkk, 2000).

Proses mikronisasi protein dilakukan dengan mencampurkan 10 mg papain dalam 0,5 ml (1%) dan PEG 20000 ; dengan perbandingan 1:1, 1:2, 1:3 dan 1:4, selanjutnya diliofilisasi selama 8 jam. Karakterisasi yang dilakukan yaitu dengan melarutkan protein liofilisat ke dalam metilen klorida dimana papain akan terdispersi dalam pelarut organik dan membentuk suspensi. Pengamatan dilakukan secara berkala selama 30 menit untuk melihat kestabilan suspensi.

Penentuan kestabilan suspensi dilakukan dengan perhitungan perbandingan tinggi endapan dengan tinggi total suspensi (Hv/Ho). Nilai perbandingan dapat dilihat

dari Tabel 4.1. Semakin tinggi nilai Hv/Ho maka endapan yang dihasilkan semakin tinggi yang menyatakan endapan yang terbentuk masih bisa disuspensikan kembali. Pengaruh pengendapan pada suspensi protein-PEG 20000 dalam pelarut organik yaitu semakin cepat protein mengalami pengendapan maka ukuran protein tersebut semakin besar. Pada penelitian ini perbandingan papain-PEG 1:1 dan 1:4 dipilih untuk proses pembuatan mikrokapsul protein. Mikropartikel yang mengandung papain selanjutnya dihitung efisiensi enkapsulasi dimana efisiensi enkapsulasi pada F II dan F III berturut-

turut sebesar 6,24%±0,91 dan 30,15%±1,66.

Rendahnya efisiensi enkapsulasi pada kedua formula ini kemungkinan disebabkan karena protein liofilisat belum mengalami pengecilan ukuran. Protein akan mengalami penurunan ukuran jika telah melewati *blending point* yaitu titik yang menyatakan perbandingan yang optimum antara protein dan polimer untuk menghasilkan ukuran protein sub-mikron. Protein dalam ukuran sub-mikron akan cenderung terdispersi dalam pelarut organik sehingga ketika dilakukan penambahan fasa luar yang merupakan

Tabel 4.1 Stabilitas Dispersi Papain 2% dengan PEG 20000 pada Berbagai Perbandingan dalam Metilen Klorida

	Rasio papain 2%-PEG 20000 berbagai konsentrasi			
	1:1	1:2	1:3	1:4
Hv/Ho	0,318	0,32	0,32	0,36
Warna supernatan	Jernih	Keruh	Keruh	Keruh

fasa air, protein akan tetap berada pada fasa minyak dan tidak keluar menuju fasa air. Oleh karena formula di atas belum menghasilkan efisiensi yang optimum, maka perlu dilakukan optimasi rasio papain dan PEG. Konsentrasi papain yang digunakan yaitu 10 mg dalam 1 ml (1%) dan konsentrasi PEG dibuat bervariasi yaitu dengan perbandingan 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, dan 1:5 selanjutnya diliofilisasi selama 8 jam. Penentuan kestabilan suspensi dilakukan dengan cara yang sama dengan sebelumnya. Protein liofilisat yang menghasilkan suspensi stabil yaitu campuran larutan protein- PEG dengan perbandingan 1:5. Pada perbandingan tersebut endapan papain dengan PEG 20000 tidak teramati, dimana suspensi tetap keruh selama 30 menit. Hasil pengamatan kestabilan suspensi dapat dilihat dalam Tabel 4.2.

Rasio yang optimum dalam mikronisasi protein selanjutnya digunakan untuk membuat mikropartikel. Mikropartikel yang dengan protein liofilisat ini menghasilkan efisiensi yang lebih baik dibandingkan formula F I, F II dan F III. Nilai efisiensi enkapsulasi untuk masing-masing formula dapat dilihat dalam Tabel 4.3. Hal ini membuktikan bahwa faktor yang paling berperan dalam meningkatkan efisiensi mikroenkapsul yaitu pengecilan ukuran protein.

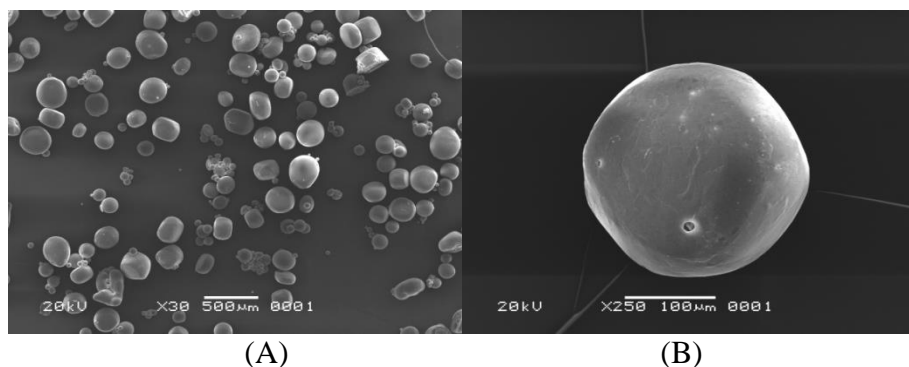
Morfologi enkapsulasi papain dalam mikropartikel untuk F IV dapat diamati pada gambar 4.6. Dari hasil foto SEM dapat diamati mikroenkapsul papain yang diperoleh mempunyai morfologi yang sferis.

Tabel 4.2 Stabilitas Dispersi Papain 1% dengan PEG 20000 pada Berbagai Perbandingan dalam Metilen Klorida

	Rasio papain 1%-PEG 20000 berbagai konsentrasi				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
Hv/Ho	0,36	0,38	0,39	0,4	1
Warna supernatan	Jernih	Jernih	Keruh	Keruh	Keruh

Tabel 4.3 Hasil Efisiensi Enkapsulasi Papain dalam Mikropartikel Tidak Berpori

Formula	% Efisiensi enkapsulasi	Sd (n=3)
F I	6.38	0.025
F II	6.24	0.91
F III	30.15	1.66
F IV	60.67	4.93



Gambar 4.6. Hasil SEM morfologi mikropartikel tidak berpori mengandung papain perbesaran 30x (A) dan 250x (B).

KESIMPULAN

Enkapsulasi protein dapat dilakukan dengan menggunakan emulsifikasi penguapan pelarut a/m/a dan p/m/a dan efisiensi enkapsulasi terbesar diperoleh dengan emulsifikasi penguapan pelarut p/m/a.

DAFTAR PUSTAKA

Castellanos, I. J., G. Cruz, R. Crespo, K. Griebenow, 2002, Encapsulation-induced Aggregation and Loss in Activity of γ -chymotrypsin and their Prevention,

Journal of Controlled Release, 81, 307-319.

Morita, T., Y. Horikiri, H. Yamahara, T. Suzuki, H. Yoshino, 2000, Formation and isolation of spherical fine protein particles through lyophilization of protein-poly(ethylene glycol) aqueous mixture, *Pharmaceutical Research*, 17(11), 1367-1373.

Morita, T., Y. Sakamura, Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, 2000, Protein Encapsulation into Biodegradable Microspheres by a Novel S/O/W emulsion

method using Poly(ethylene glycol) as a Protein Micronization Adjuvant, **Journal of Controlled Release**, 69, 435-444.

Morita, T., Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, Applicability of Various Amphiphilic Polymers to the Modification of Protein Release Kinetics From Biodegradable Reservoir-Type Microspheres, 2000, **Journals of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 51, 45-53.

Rowe, R. C., 2003, **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 4th ed., Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London, 19-24.

Suciati, T., F. R. A. J. Rose, K. M. Shakesheff,. 2004, Development of a microparticle-based scaffold for tissue engineering, **British Society for Matrix**

Biology and UK Tissue and Cell Engineering Society.

Vacanti, A. and C. P. Vacanti, 2000, **The History and Scope of Tissue Engineering in Principles of Tissue engineering** (eds Lanza RP, Langer R, Vacanti J) 2ed., 3-7.

Wise, Donald L, 2000, **Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology**, Marcel Dekker Inc, New York, 271-309, 413-417.