

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. MIKROENKAPSULASI

Mikroenkapsulasi adalah teknologi untuk menyalut atau melapisi suatu zat inti dengan suatu lapisan dinding polimer, sehingga menjadi partikel-partikel kecil berukuran mikro. Dengan adanya lapisan dinding polimer ini, zat inti akan terlindungi dari pengaruh lingkungan luar. Bahan inti dapat berupa padatan, cairan atau gas. Mikro kapsul yang terbentuk dapat berupa partikel tunggal atau bentuk agregat dan biasanya memiliki rentang ukuran partikel antara 5-5000 mikrometer. Ukuran tersebut bervariasi tergantung metode dan ukuran partikel bahan inti yang digunakan (9, 10, 11).

1. Keuntungan dan kerugian mikrokapsul

a. Keuntungan.

- 1) Dengan adanya lapisan dinding polimer, zat inti akan terlindungi dari pengaruh lingkungan luar.
- 2) Mikroenkapsulasi dapat mencegah perubahan warna dan bau serta dapat menjaga stabilitas zat inti yang dipertahankan dalam jangka waktu yang lama.
- 3) Dapat dicampur dengan komponen lain yang berinteraksi dengan zat inti.

b. Kerugian.

- 1) Adakalanya penyalutan bahan inti oleh polimer kurang sempurna atau tidak merata sehingga akan mempengaruhi pelepasan zat inti dari mikro kapsul.
- 2) Dibutuhkan teknologi mikroenkapsulasi.
- 3) Harus dilakukan pemilihan polimer penyalut dan pelarut yang sesuai dengan bahan inti agar diperoleh hasil mikro kapsul yang baik.

2. Tujuan mikroenkapsulasi

Proses mikroenkapsulasi memiliki beberapa tujuan, yaitu:

- a. Mengubah bentuk cairan menjadi padatan.
- b. Melindungi inti dari pengaruh lingkungan.
- c. Memperbaiki aliran serbuk.
- d. Menutupi rasa dan bau yang tidak enak.
- e. Menyatukan zat-zat yang tidak tersatukan secara fisika kimia.
- f. Menurunkan sifat iritasi inti terhadap saluran cerna.
- g. Mengatur pelepasan bahan inti.
- h. Memperbaiki stabilitas bahan inti.

3. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses mikroenkapsulasi

Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses mikroenkapsulasi, antara lain sifat fisikokimia bahan inti atau zat aktif, bahan penyalut yang digunakan, tahap proses mikroenkapsulasi (tunggal/bertingkat), sifat dan struktur dinding mikrokapsul serta kondisi pembuatan (basah/kering) (9).

4. Sifat zat aktif untuk mikrokapsul

Zat aktif yang dapat dibuat dalam sistem mikrokapsul dapat berupa zat padat, cair ataupun gas, dengan ukuran partikel yang kecil. Sifat-sifat zat aktif dari sistem mikroenkapsulasi tergantung dari tujuan mikroenkapsulasi tersebut. Dalam penelitian ini, mikrokapsul yang dilakukan bertujuan untuk menyalut bahan inti yaitu insulin guna meningkatkan stabilitas dan bioavailabilitasnya (12).

5. Komponen mikrokapsul (9)

a. Bahan inti

Inti adalah bahan spesifik yang akan disalut, dapat berupa zat padat, cair ataupun gas. Komposisi material inti dapat bervariasi, misalnya

pada bahan inti cair dapat terdiri dari bahan terdispersi atau bahan terlarut. Sedangkan bahan inti padat dapat berupa zat tunggal atau campuran zat aktif dengan bahan pembawa lain seperti stabilisator, pengencer, pengisi, penghambat atau pemacu pelepasan bahan aktif, dan sebagainya. Selain itu, bahan inti yang digunakan sebaiknya tidak larut atau tidak bereaksi dengan bahan penyalut yang digunakan.

b. Bahan penyalut.

Bahan penyalut adalah bahan yang digunakan untuk melapisi inti dengan tujuan tertentu seperti menutupi rasa dan bau yang tidak enak, perlindungan terhadap pengaruh lingkungan, meningkatkan stabilitas, mencegah penguapan, kesesuaian dengan bahan inti maupun bahan lain yang berhubungan dengan proses penyalutan serta sesuai dengan metode mikroenkapsulasi yang digunakan. Bahan penyalut harus mampu memberikan suatu lapisan tipis yang kohesif dengan bahan inti, dapat bercampur secara kimia, tidak bereaksi dengan inti (bersifat inert), dan mempunyai sifat yang sesuai dengan tujuan penyalutan. Bahan penyalut yang digunakan dapat berupa polimer alam, semi sintetik, maupun sintetik. Jumlah penyalut yang digunakan antara 1-70%, dan pada umumnya digunakan 3-30% dengan ketebalan dinding penyalut 0,1-60 mikrometer.

c. Pelarut.

Pelarut adalah bahan yang digunakan untuk melarutkan bahan penyalut dan mendispersikan bahan inti. Pemilihan pelarut biasanya berdasarkan sifat kelarutan dari bahan inti atau zat aktif dan bahan penyalut, dimana pelarut yang digunakan tersebut tidak atau hanya sedikit melarutkan bahan inti tetapi dapat melarutkan bahan penyalut. Pelarut polar akan melarutkan pelarut polar dan pelarut nonpolar akan melarutkan pelarut non polar.

Untuk melarutkan penyalut juga dapat digunakan pelarut tunggal atau pelarut campuran. Penggunaan pelarut campuran seringkali memberikan kesulitan dalam proses penguapan pelarut, misalnya perbedaan kecepatan penguapan antara dua atau lebih pelarut akan mengakibatkan pemisahan komponen pelarut yang terlalu cepat, sehingga penyalut menggumpal. Untuk menghindari hal tersebut biasanya digunakan campuran azeotrop, yaitu campuran pelarut dengan komposisi dan titik didih yang tetap dimana selama proses penguapan komposisi campuran tidak berubah. Jika digunakan campuran azeotrop maka campuran tersebut harus dapat melarutkan penyalut dengan baik.

6. Metode pembuatan mikrokapsul

Metode pembuatan mikrokapsul cukup beragam, diantaranya adalah koaservasi pemisahan fase, semprot kering, semprot beku, penguapan pelarut, suspensi udara, proses multi lubang sentrifugal, penyalutan di dalam panci, polimerisasi, dan lain-lain (9). Pada penelitian ini digunakan metode pembuatan mikrokapsul secara emulsifikasi. Pada metode emulsifikasi atau gelasi internal, larutan alginat yang mengandung garam kalsium tidak larut didispersikan pada emulsi air dalam minyak dan gel diperoleh dari pengasaman dengan melarutkan kalsium pada larutan asam yang menyebabkan lepasnya ion kalsium. Teknik ini menyediakan pengaturan stabilitas biologi insulin. Mikrokapsul yang memiliki ukuran kurang dari 100 μm dapat diproduksi dengan emulsifikasi/gelasi internal (13).

7. Mekanisme pelepasan obat dari mikrokapsul

Pelepasan obat dari bentuk mikrokapsul dapat melalui berbagai cara yaitu melalui proses difusi melewati lapisan polimer, erosi dari lapisan polimer atau melalui kombinasi dari erosi dan difusi. Umumnya obat yang dibuat dengan cara ini lebih banyak dilepaskan melalui difusi membran. Cairan dari saluran pencernaan berdifusi melalui membran ke dalam sel, kemudian obat akan melalui difusi pasif dari larutan konsentrasi tinggi di dalam sel kapsul melalui membran ke tempat konsentrasi rendah pada cairan saluran

pencernan. Jadi kecepatan pelepasan obat ditentukan oleh sifat difusi obat pada membran (14).

8. Evaluasi mikrokapsul

Pembuatan suatu produk obat khususnya mikrokapsul, tidak lepas dari berbagai evaluasi untuk mengontrol kualitas produk dan mengetahui layak tidaknya mikrokapsul yang diperoleh untuk digunakan dan dipasarkan. Evaluasi yang dilakukan pada mikrokapsul meliputi pemeriksaan morfologi mikrokapsul, pengukuran partikel, berat mikrokapsul yang diperoleh, pengukuran kadar air, penentuan kandungan zat inti, penentuan persentase zat inti yang tersalut, uji pelepasan *in vitro*. (15, 16, 17).

a. Pemeriksaan morfologi mikrokapsul.

Pemeriksaan morfologi mikrokapsul dengan menggunakan *scanning electron microscopy* untuk mengetahui sifat pelepasan obat, karakteristik permukaan dan adanya pori-pori pada permukaan mikrokapsul.

b. Pengukuran partikel.

Pengukuran partikel dievaluasi dengan menggunakan *particle size analyzer*.

c. Berat mikrokapsul yang diperoleh.

Berat mikrokapsul yang diperoleh ditimbang menggunakan timbangan analitik.

d. Penetapan kadar air.

Mikrokapsul diukur kadar airnya menggunakan alat pengukur kadar lembab (*moisture balance*).

e. Penentuan kandungan zat inti.

Penentuan kandungan obat mikrokapsul dilakukan untuk mengetahui banyaknya zat aktif yang dapat terkapsulasi dan efisiensi metode yang digunakan. Mikrokapsul dapat mengandung bahan inti sampai 99% dihitung terhadap berat mikrokapsul. Metode yang digunakan tergantung dari kelarutan bahan penyalut dan bahan inti.

Jika bahan inti dan bahan penyalut larut dalam pelarut bukan air, maka penentuan kandungan mikrokapsul dilakukan dengan melarutkan mikrokapsul dalam pelarut organik yang sesuai dan kadar obat kemudian ditentukan dengan metode analitik yang sesuai. Jika hanya bahan inti saja yang larut dalam air, sedangkan bahan penyalutnya tidak larut maka dapat dilakukan pelarutan mikrokapsul dalam air dengan pengadukan kecepatan

tinggi, sehingga bahan inti akan terlarut atau dapat pula dilakukan penggerusan mikrokapsul sehingga penyalut pecah dan inti dapat terlarut dalam pelarut yang sesuai. Setelah itu dilakukan penyaringan untuk menghilangkan fragmen polimer yang tidak larut. Bahan inti selanjutnya ditentukan kadarnya dengan metode analisis yang sesuai.

f. Penentuan persentase zat inti yang tersalut.

Dari penentuan kandungan obat dalam mikrokapsul yang diperoleh dapat dihitung persentase zat aktif yang tersalut dengan menggunakan rumus:

$$F_p = \frac{F_m}{F_t} \times 100\%$$

dimana F_p = Persentase zat tersalut.

F_m = Fraksi zat aktif dalam mikrokapsul.

F_t = Fraksi teoritis zat aktif dalam mikrokapsul.

g. Uji pelepasan *in vitro*.

Laju pelepasan *in vitro* adalah jumlah bahan padat yang terlarut pada setiap waktu tertentu. Proses pelepasan zat aktif ini sangat berpengaruh terhadap kecepatan dan besarnya ketersediaan zat aktif dalam tubuh dan selanjutnya akan mempengaruhi respon klinis yang akan dihasilkan oleh

suatu sediaan. Untuk obat yang kelarutannya sangat kecil, laju pelepasan menentukan proses absorpsi obat pada saluran cerna.

Uji pelepasan *in vitro* ini dilakukan untuk mengukur laju dan jumlah pelarutan obat dalam suatu medium dengan adanya satu atau lebih bahan tambahan yang terkandung dalam zat aktif.

Meyer dan Whitney menggambarkan proses pelepasan bahan padat dimulai dengan pelarutan bahan pada permukaan partikel zat aktif, yang membentuk larutan jernih di sekeliling partikel. Obat yang terlarut dalam larutan jernih diasumsikan sebagai stagnan layer atau lapisan tetap yang tipis, yang selanjutnya berdifusi dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah. Adapun persamaan yang menggambarkan persamaan disolusi adalah:

$$dC/dt = k (C_s - C)$$

dimana dC = Perubahan konsentrasi suatu fungsi obat.

k = Konstanta kecepatan disolusi.

C_s = Konstanta jenuh larutan.

C = Konstanta larutan pada waktu tertentu.

B. INSULIN

1. Sifat fisiko kimia insulin

Insulin adalah suatu hormon dari golongan protein yang dihasilkan oleh pankreas. Insulin dibuat dengan cara modifikasi enzimatik atau dengan cara teknologi rekombinan asam deoksi ribonukleat (DNA) dalam mikroorganisme, diikuti dengan cara pemurnian yang sesuai. Jika insulin dibuat dengan teknologi rekombinan DNA, pembuatan didasarkan pada sistem vektor inang yang telah disetujui. Insulin dibuat dalam kondisi yang dirancang untuk mengurangi kontaminasi mikroba (18).

Rumus molekul insulin manusia: $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$.

Pemerian: serbuk putih atau hampir putih.

Kelarutan: praktis tidak larut dalam air, etanol, kloroform dan eter, larut dalam larutan encer asam-asam mineral, dan dalam larutan alkali hidroksida yang diikuti dengan peruraian.

Serapan cahaya: Serapan larutan 0,05% dalam asam klorida 0,01 N menunjukkan maksimal pada 276 nm dan serapan 0,48 sampai 0,56.

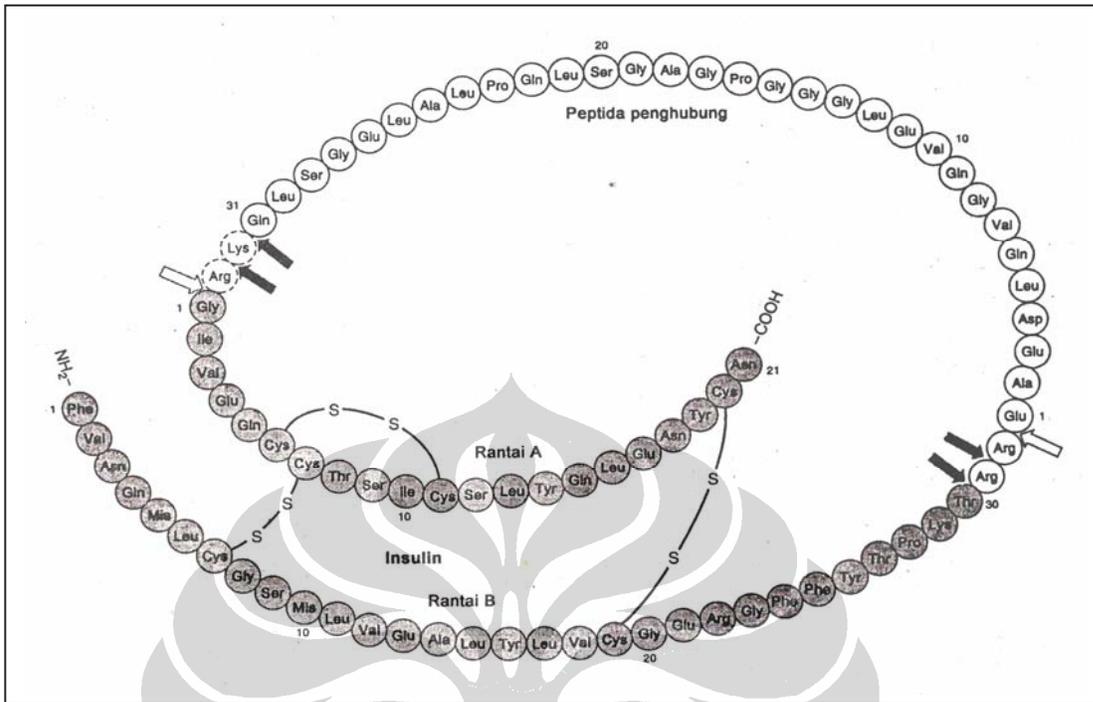
Penetapan potensi: perkiraan potensi tidak kurang dari 90% dan tidak lebih dari 125% dari potensi yang tertera pada etiket.

Wadah dan penyimpanan: dalam wadah kedap udara, terlindung dari cahaya.

Insulin memiliki berat molekul kira-kira 6000. Hormon ini memiliki dua rantai. Rantai A yang terdiri dari 21 asam amino dan rantai B yang terdiri dari

30 asam amino. Pada rantai A dan B terdapat dua jembatan disulfida yaitu antara asam amino ke 7 pada rantai A dengan asam amino ke 7 pada rantai B dan asam amino ke 20 pada rantai A dengan asam amino ke 19 pada rantai B. Selain itu, masih ada jembatan disulfida antara asam amino ke 6 dan asam amino ke 11 pada rantai A (2).

Insulin disintesis sebagai preprohormon berat molekul sekitar 11.500 dan merupakan prototipe untuk peptida yang diproses dari molekul prekursor yang lebih besar. Rangkaian pra atau rangkaian pemandu yang bersifat hidrofobik dengan 23 asam amino mengarahkan molekul tersebut ke dalam sisterna retikulum endoplasma dan kemudian dikeluarkan. Proses ini menghasilkan molekul proinsulin dengan berat molekul 9000 yang menyediakan bentuk yang diperlukan bagi pembentukan jembatan disulfida yang sempurna. Penyusunan proinsulin dimulai dari bagian terminal amino, adalah rantai B - peptida (C) penghubung - rantai A. Molekul proinsulin menjalani serangkaian pemecahan peptida yang spesifik sehingga terbentuk insulin yang matur dan peptida C dengan jumlah ekuimolar (2).



Gambar 1. Struktur proinsulin manusia (2).

2. Stabilitas insulin

Berbagai proses yang dapat menghilangkan aktivitas insulin diantaranya adalah esterifikasi gugus karboksil, oksidasi atau reduksi, pengrusakan oleh enzim proteolitik misalnya kimotripsin dan pepsin, enzim yang dapat mendegradasi insulin yaitu glutathion insulin transhidrogenase yang menggunakan glutathion tereduksi untuk memecah jembatan disulfida, modifikasi pada gugus amino bebas atau gugus hidroksil alifatik (19).

Umumnya modifikasi struktur akan menghilangkan aktifitas biologik. Struktur insulin berbagai spesies berbeda dalam susunan aminonya.

Perbedaan tersebut tidak menyebabkan perbedaan aktivitas biologik tetapi menyebabkan perbedaan imunologik (2).

Hormon insulin tidak memiliki protein pembawa di dalam plasma, sehingga waktu paruhnya dalam plasma kurang dari 3-5 menit pada kondisi normal. Organ utama yang terlibat dalam metabolisme insulin adalah hati, ginjal dan plasenta. Sekitar 50% dari insulin yang dikeluarkan pankreas melalui aliran darah ke hati (2).

3. Mekanisme kerja insulin (2)

Kerja insulin dimulai ketika hormon tersebut terikat dengan sebuah reseptor glikoprotein yang spesifik pada permukaan sel target. Kerja hormon insulin yang beragam dapat terjadi dalam waktu beberapa detik atau beberapa menit (kerja pengangkutan, aktivasi dan inhibisi enzim, sintesis RNA), atau sesudah beberapa jam (kerja sintesis protein serta DNA dan pertumbuhan sel). Ketika insulin terikat dengan reseptor, beberapa peristiwa yang terjadi diantaranya terjadi perubahan bentuk reseptor, reseptor akan berikatan silang dan membentuk mikroagregat, reseptor diinternalisasi yang merupakan sarana untuk mengendalikan konsentrasi serta pergantian reseptor dan kemudian dihasilkan satu atau lebih sinyal

Insulin memiliki efek penting pada metabolisme karbohidrat, lemak dan protein. Hormon insulin menurunkan kadar glukosa, asam lemak, dan asam amino dalam darah serta mendorong penyimpanan nutrisi-nutrisi

tersebut. Pada waktu molekul-molekul ini memasuki darah selama keadaan absorptif, insulin meningkatkan penyerapan molekul oleh sel dan diubah menjadi glikogen, trigliserida, dan protein. Insulin menjalankan efeknya yang beragam dengan mengubah transportasi nutrisi spesifik, dari darah ke dalam sel atau dengan mengubah aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam jalur metabolik tertentu.

4. Sediaan insulin (19)

Sediaan insulin berdasarkan sifatnya dibagi atas tiga jenis yaitu dengan masa kerja cepat, masa kerja sedang dan masa kerja lama.

Tabel 1

Sifat berbagai sediaan insulin

Jenis	Sediaan	Mula kerja (jam)	Masa kerja (jam)	Dapat dicampur dengan
Kerja cepat	Insulin regular manusia	1	6	Semua sediaan
	Insulin regular dari kristal seng insulin	1	8	Semua sediaan
	Insulin semilente (suspensi seng insulin)	1	14	Sediaan lente

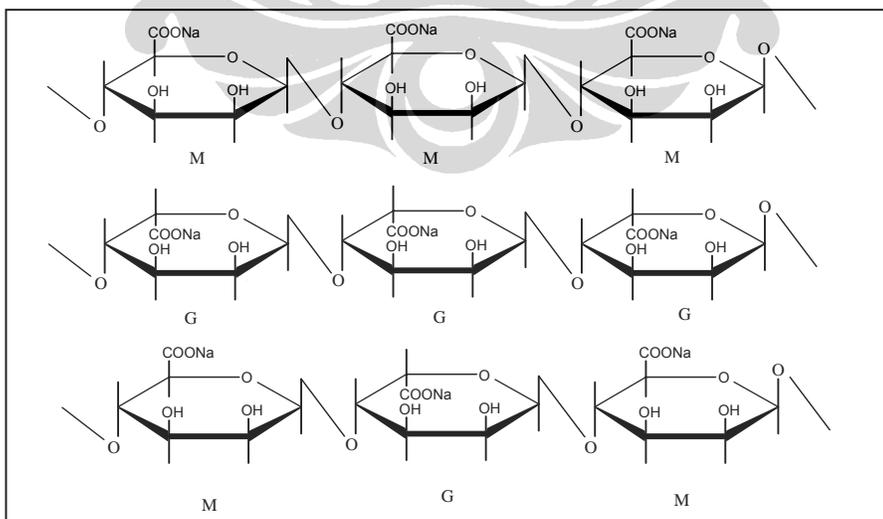
Kerja sedang	Suspensi insulin manusia	2	24	Insulin reguler
	Suspensi seng insulin (insulin lente)	2	24	Semilente
	Seng insulin globin	2	18	-
Kerja lama	Seng protamin insulin	7	36	Insulin reguler
	Insulin ultralente	7	36	Insulin reguler

5. Efek samping insulin (19)

Efek samping pemberian insulin dapat berupa reaksi alergi umum seperti urtikaria, erupsi kulit, gangguan gastrointestinal (mual muntah, diare), gangguan penglihatan, gangguan pernafasan (sesak napas, asma) dan yang sangat jarang adalah hipotensi dan syok yang diakhiri kematian. Lipodistrofi berupa atropi atau hipertropi, lipoatropi terjadi lekukan di bawah kulit tempat suntikan akibat atrofi jaringan lemak. Lipohipertropi ialah pengumpulan jaringan lemak subkutan pada tempat insulin disuntikan akibat efek lipogenik insulin.

C. NATRIUM ALGINAT

Alginat adalah senyawa dalam bentuk garam dan turunan asam alginat. Alginat merupakan polimer yang membentuk koloid hidrofilik yang diekstraksi dengan garam alkali dari bermacam-macam jenis alga laut coklat (*Phaeophyceae*). Rumus molekul natrium alginat adalah $(C_6H_7O_6Na)_n$. Bobot molekul 198,11 (per unit) dan 10.000-600.000 (makromolekul). Titik lebur lebih dari 300 °C dan pH = 7,2 untuk 1% larutan air. Larut dalam air dan mengental, tidak larut dalam larutan alkohol dengan alkohol lebih dari 30%, tidak larut dalam eter, kloroform dan asam dengan pH kurang dari tiga. Alginat sebagai polimer dari asam beta -d- mannuronat dengan ikatan 1-4 dan polimer linier glukoronat yang terdiri dari campuran dari residu β -(1->4)-L- asam guluronat. Persen kemurnian natrium alginat 91-106% dan kelembaban pada 105 °C maksimal 15% (6, 20).



Gambar 2. Struktur natrium alginat (6).

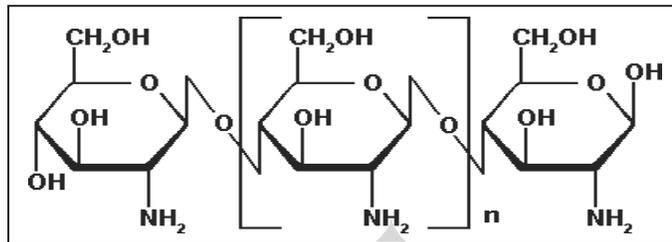
Alginat dari jenis *Laminaria* mengandung 30-70% asam-1-guluronat, sedangkan dari jenis *Macrocistis* mengandung 20-40%. Tepung alginat berwarna putih sedangkan natrium alginat berwarna gading, tidak berasa dan hampir tidak berbau. Kandungan air yang lebih tinggi terdapat dalam natrium alginat karena garam bersifat higroskopis. Viskositas larutan alginat dipengaruhi oleh konsentrasi, bobot molekul, pH, suhu dan keberadaan garam. Alginat yang mengandung kation seperti K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , larut dalam air dingin dan panas membentuk larutan yang stabil. Natrium alginat digunakan pada pembentukan gel, penstabil, pengemulsi, dan penebal (21, 22).

D. KITOSAN

Kitosan adalah polimer alami yang diperoleh dari deasetilasi kitin. Kitin adalah polisakarida terbanyak kedua setelah selulosa. Sumber utama kitin adalah kulit *Crustaceae* dan cumi-cumi. Selain itu juga terdapat dalam dinding sel fungi dan mikroorganisme lain. Kitosan merupakan polimer yang aman, tidak beracun, biokompatibel, biodegradabel, dan dapat digunakan pada sediaan mukoadhesif. Polimer ini juga diketahui dapat digunakan pada sistem pelepasan terkendali (6).

Secara fisik kitosan berupa serbuk berwarna putih atau kuning dengan ukuran partikel kurang dari 30 mikrometer, berat jenisnya 1,35 hingga 1,40 g/cm³. Kitosan terdiri dari β (1-4)-2-amino-2-deoksi-D-glukosa (D-

glukosamin) dan 2-asetamido-2-deoksi-D-glukosa (N-asetil-D-glukosamin) mempunyai rumus struktur



Gambar 3. Struktur kitosan (6).

Kitosan bersifat mukoadhesif akibat terjadinya ikatan hidrogen gugus amina dengan gugus bermuatan negatif pada musin. Kitosan juga merupakan sumber polimer multifungsi karena mengandung tiga jenis gugus fungsi yaitu amina, gugus hidroksil dan keton. Adanya gugus fungsi ini menyebabkan kitosan mempunyai aktivitas kimia yang sangat tinggi (8).

Kitosan merupakan senyawa yang tidak larut dalam air, pelarut organik dan larutan basa yang memiliki pH diatas 6,5. Kitosan sangat mudah larut dalam larutan asam, termasuk asam formiat, asam sitrat, asam asetat, dan asam lainnya kecuali dalam asam sulfat (23).

Proses pembuatan kitosan melalui tiga proses kimiawi, yaitu proses penghilangan protein (deproteinasi) dengan menggunakan larutan basa, penghilangan mineral dengan menggunakan larutan asam, lalu dilanjutkan proses deasetilasi dengan memasukkannya ke dalam larutan basa. Hasilnya berupa kitosan dalam bentuk kristal berwarna putih yang larut baik dalam asam asetat (6).

Kitosan dapat digunakan di berbagai macam aplikasi industri diantaranya adalah pengolahan limbah dan air (seperti penyerap logam berat, minyak dan lemak, penjernih air, campuran plastik biodegradabel), bahan tambahan dan bahan pembantu di bidang farmasi, kesehatan dan kosmetik (seperti serat makanan, lensa kontak, kapsul, pelindung kulit, penyembuh luka bakar, bahan benang operasi, pengisi tulang dan gigi buatan, pengobatan kanker dan anti bakteri), fotografi, pembuatan kertas, pengawet kayu dan peternakan (peningkat gizi dan bobot makan ternak) (23).

Garam kitosan larut dalam air dengan kelarutan yang dipengaruhi oleh derajat deasetilasi (harga pKa kitosan) dan pH medium. Kitosan dengan derajat deasetilasi yang relatif rendah (40%) dapat larut pada medium pH hingga 9, sedangkan kitosan dengan derajat deasetilasi sekitar 85% dapat larut pada medium pH hingga 6,5. Kelarutan kitosan juga dipengaruhi oleh penambahan garam ke dalam larutan. Semakin besar kekuatan ion maka kelarutan makin kecil, viskositas larutan akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi kitosan dan penurunan temperatur, serta peningkatan derajat deasetilasi. Hal ini disebabkan karena konformasi yang berbeda pada molekul kitosan dengan derajat deasetilasi yang tinggi dan yang rendah. Pada kitosan dengan derajat deasetilasi tinggi, yang sangat bermuatan, konformasi kitosan cenderung lebih fleksibel, sedangkan pada derajat deasetilasi yang lebih rendah molekul kitosan berbentuk seperti batang atau menggulung karena kurang bermuatan (6).

E. BOVIN SERUM ALBUMIN (24)

Bovin serum albumin (BSA) adalah protein globular yang berukuran besar (66.000 Dalton). BSA dapat rusak karena pemanasan. Albumin merupakan kelompok protein yang larut dalam air. Albumin adalah protein yang paling banyak dalam sistem sirkulasi. Albumin pada sintesis awalnya dalam bentuk preproalbumin di hati. Serum albumin memiliki nilai viskositas intrinsik 3,7-4,2 mL/g. Peningkatan viskositas tergantung pada peningkatan ikatan disulfida BSA. BSA digunakan dalam komponen media sel untuk regenerasi tanaman dari kultur sel, pembentuk busa, gelasi dan pengikat ligan.

F. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS (ELISA) (25, 26)

Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) adalah teknik biokimia yang digunakan terutama dalam imunologi untuk mendeteksi keberadaan antibodi atau antigen dalam sampel. ELISA menggunakan dua macam antibodi, yang pertama yaitu antibodi yang spesifik terhadap antigen, dan antibodi yang lain bereaksi dengan kompleks antigen-antibodi, dan digabungkan dengan suatu enzim. Antibodi kedua ini dapat menyebabkan substrat kromogenik atau fluorogenik untuk menghasilkan tanda/signal. Prinsip metode immunoassays adalah reaksi antara antigen dan antibodi spesifik, hasil reaksi dapat diamati dengan mempergunakan suatu label atau marker.

Teknik yang paling banyak digunakan adalah dengan memberi label suatu enzim dan reaksi dilakukan dengan cara mengabsorpsi antigen atau antibodi pada suatu fase, sehingga metode ini disebut sebagai metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Enzim dapat dilabel baik pada antibodi maupun pada antigen, yang akan membentuk warna dengan penambahan suatu substrat dan pembentuk warna. Pengujian secara kuantitatif dapat dilakukan dengan mengamati intensitas warna yang terbentuk.

Pada pengujian dengan metode ELISA dibutuhkan fase padat sebagai fase untuk pengikatan antigen dan antibodi. Yang paling banyak digunakan adalah polistiren mikroplat yang mempunyai 96 lubang sebagai fase padat. Antibodi atau antigen yang dimasukkan ke dalam sumur mikroplat akan menempel pada permukaan, akan teradsorpsi secara pasif pada permukaan polistiren. Sehingga akan terbentuk kompleks yang juga melekat pada permukaan polistiren karena telah terjadi reaksi antara antibodi spesifik dengan antigen, apabila antibodi atau antigen tersebut ditambahkan pada tahapan berikutnya. Antibodi atau antigen bebas yang tidak bereaksi dipisahkan dengan pencucian. Setelah itu, ditambahkan pereaksi yang dapat membentuk warna dengan enzim yang terlabel pada antigen atau antibodi.

Metode ELISA terdiri atas metode langsung dan tidak langsung. Metode langsung mengadsorpsikan antibodi pada mikroplat. Metode ini digunakan untuk pemeriksaan adanya antigen tertentu pada sampel, misalnya serum. Metode tidak langsung mengadsorpsikan antigen pada

mikroplat. Metode ini digunakan untuk pemeriksaan adanya antibodi tertentu pada sampel. Metode ELISA memiliki kelebihan diantaranya sensitif, selektif, cepat.

Pada penelitian ini, metode ELISA yang digunakan tidak menggunakan prinsip antigen-antibodi dengan pemberian label dan pewarnaan, tetapi hanya memanfaatkan sifat serapan UV-Vis yang diberikan oleh detektor pada alat ELISA reader terhadap sampel, karena berdasarkan literatur yang ada, insulin dan BSA dapat diukur konsentrasinya berdasarkan serapan pada panjang gelombang UV-Vis. Digunakan alat ELISA reader dengan detektor UV-Vis karena lebih sensitif dibandingkan dengan spektrofotometer UV-Vis.