

STABILISASI AKTIVITAS LISOZIM DALAM SEDIAAN SERBUK BEKU KERING PADA SERUM OTOLOGUS MENGGUNAKAN LIOPROTEKTAN SUKROSA

Rostina Melpin¹, Iman P. Maksum*¹, Toto Subroto¹, Sutarya Enus², Soetijoso Soemitro¹

¹Departemen Ilmu Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran, ²Departemen Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran-Rumah Sakit Mata Cicendo Bandung

*E-mail: Ip_maksum@unpad.ac.id

Abstrak

Penggunaan serum autologus dalam bentuk tetes mata telah dilaporkan sebagai terapi baru pada sindrom *dry eye*. Serum autologus memiliki sifat biomekanik serta biokimia yang mirip dengan air mata normal, mengandung faktor pertumbuhan, fibronektin, lisozim dan vitamin. Serum otologos dalam bentuk cairan hanya dapat bertahan selama satu bulan pada penyimpanan 4⁰C. Oleh karena itu, serum otologus perlu dibuat dalam bentuk serbuk beku kering melalui proses liofilisasi, namun proses ini dapat menyebabkan terjadinya agregasi protein, oleh sebab itu terjadinya agregasi protein perlu dihindari. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan stabilitas aktivitas lisozim serum otologus sediaan serbuk beku kering setelah proses liofilisasi dengan penambahan lioprotektan sukrosa dengan konsentrasi 30, 40, 60, 100 dan 150 mM. Serum dikeringkan melalui proses liofilisasi, kemudian disimpan selama enam bulan pada suhu ruang dan 4⁰C kemudian dianalisis dengan metode turbiditas dan HPLC. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas lisozim natif yaitu 1133,3 U/mL dan aktivitas lisozim setelah proses liofilisasi dengan penambahan sukrosa selama enam bulan penyimpanan pada suhu 4⁰C yaitu 900 U/mL, terjadi penurunan sebanyak 20%. Hal ini juga dibuktikan dengan penentuan karakter lisozim menggunakan HPLC, terlihat penurunan luas area 20%. Adapun lisozim natif yang diperoleh sekitar 5,8 mg/mL sedangkan setelah penyimpanan 3,7 mg/mL. Nilai ini masih berada pada rentang kadar yang dapat digunakan. Diantara konsentrasi lioprotektan yang digunakan, sukrosa dengan penambahan konsentrasi 60 mM menunjukkan potensi terbaik menjaga lisozim selama proses liofilisasi dan selama tiga bulan penyimpanan sebesar 4,8 mg/mL.

Kata kunci: aktivitas lisozim, serum otologus, liofilisasi, lioprotektan sukrosa.

STABILIZATION OF LYSOZYME ACTIVITIES IN SOLID PROTEINS OF AUTOLOGOUS SERUM BY USING LYOPROTECTANT SUCROSE

Abstract

The use of autologous serum in the form of eye drops has been reported as a new treatment for dry eye syndrome. They are by nature non-allergenic and their biomechanical and biochemical properties are similar to normal tears, because they contain components such as growth factors, fibronectin, lysozyme and vitamins. However, serum autologous in liquid can only survive for one month at 4⁰C storage. Therefore, the autologous serum is made in dry forms (solid proteins) through lyophilization, but aggregation of proteins in lyophilization process must be solved. This research aims to study stability of lysozyme activity in solid proteins after lyophilization process and addition of lyoprotectant sucrose 30, 40, 60, 100 and 150 mM. It was analyzed by turbidity method and HPLC. These studies showed that the activity of lysozyme native is 1133.33 U/mL and activity after after lyophilization process with the addition of sucrose for six months storage at 4⁰C is 900 U/mL. This suggests that the 20 % reduction in activity of lysozyme. This is also evidenced by the determination of the character of lysozyme using HPLC seen a decrease in the area of 20%. The native of lysozyme obtained about 5.8 mg/mL, while after the deposit of 3.7 mg/mL. This value is still in the range that can be used. The addition of 60 mM sucrose showed the best potential of lyoprotectant to keep lysozyme during the process of lyophilization and the three months storage is 4.8 mg/mL.

Keywords: activities of lysozyme, autologous serum, lyophilization, lyoprotectant sucrose.

Pendahuluan

Penggunaan serum otologus dalam bentuk tetes mata telah dilaporkan sebagai pengobatan pada berbagai kelainan permukaan bola mata yang berat dan kronis, termasuk *dry eye*.¹⁻³ Tetes mata serum otologus diambil dari darah pasien penderita *dry eye*, kemudian dibuat sebagai sediaan yang tidak menggunakan pengawet, bersifat alami, tidak menimbulkan reaksi alergi serta mengandung komponen yang sama dengan air mata manusia.⁴ Komponen-komponen tersebut diantaranya yaitu: faktor pertumbuhan EGF dan TGF- β , fibronektin, vitamin E dan vitamin A. Komponen tambahan serum otologus juga mengandung immunoglobulin seperti IgG, IgA, lisozim dan faktor suplemen yang bersifat bakterisida.⁵ Komponen-komponen ini berperan penting dalam stabilisasi kornea dan epitel konjungtiva. Protein anti mikroba sendiri, dengan keberadaan lisozim yang dikeluarkan oleh kelenjar air mata, berfungsi menjaga kesehatan kornea dan epitel konjungtiva.⁶ Pengurangan anti mikroba pada permukaan epitel akan menyebabkan munculnya bakteri yang memungkinkan adanya kontaminan dan infeksi.⁴ Keberadaan lisozim yang melisis pematangan pada polimer peptidoglikan dinding sel bakteri yang mengarahkan pada kematian sel, berperan penting pada proses penghancuran bakteri saat penyembuhan luka pada pasien penderita *dry eye*.

Sifat sediaan tetes mata serum otologus yang mudah rusak, menuntut penyimpanan pada suhu yang rendah untuk menjaga keaktifan komponen yang ada pada serum. Serum yang mengandung komponen-komponen aktif dapat berakibat kurang baik pada permukaan mata jika digunakan pada

konsentrasi yang tidak tepat, dan pada masa kadaluarsa.⁷ Serum otologus dapat bertahan selama satu bulan jika disimpan pada suhu 4°C dan tiga bulan pada suhu -20°C.³ Kebutuhan akan sediaan serum yang lebih praktis dalam segi penyimpanan dan penggunaannya sangat membantu bagi masyarakat yang membutuhkan terapi jangka panjang.

Liofilisasi merupakan metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas jangka panjang obat-obat labil khususnya dari golongan protein, melalui proses penghilangan air.⁸ Metode ini dapat mengurangi degradasi protein baik secara kimiawi maupun fisika pada padatan hasil proses liofilisasi,⁹ namun proses ini juga seringkali merusak struktur protein yang pada akhirnya akan menyebabkan terjadinya denaturasi dan agregasi protein ketika dilarutkan kembali dalam air.^{10,11} Perlindungan terhadap konformasi protein dalam proses liofilisasi, merupakan hal penting untuk mempertahankan efek farmakologis serta menurunkan resiko imunogenisitas dari produk.¹²

Sakarida non pereduksi seperti sukrosa yang dikenal sebagai stabilisator mampu melindungi protein selama proses liofilisasi dan proses penyimpanan selanjutnya.¹¹ Interaksi antara gugus hidroksil dari gula non pereduksi dengan molekul protein pada bentuk bubuk dapat mencegah keluarnya tapak-tapak hidrofobik yang kemudian dapat menyebabkan terjadinya agregasi. Sukrosa dengan berbagai variasi konsentrasi lioprotektan 60, 100, 150, 200 dan 250 mM telah digunakan untuk meningkatkan stabilitas protein rhuMab HER2, yang pada akhirnya dapat meningkatkan masa simpan sediaan protein.¹³ Penelitian dengan menentukan sediaan serum dalam sediaan serbuk

beku kering, sebagai tetes obat mata dengan menggunakan lioprotektan sukrosa (60 mM), juga telah dilakukan dimana sukrosa mampu mempertahankan kestabilan beberapa komponen yang ada pada serum otologus yaitu EGF dan TGF- sampai 6 bulan pada suhu 4°C.^{14,15}

Berdasarkan uraian di atas maka pada penelitian ini, dilakukan kuantifikasi kestabilan salah satu komponen serum otologus yaitu lisozim dalam sediaan serbuk beku kering menggunakan lioprotektan sukrosa dengan penambahan berbagai konsentrasi (30, 40, 60, 100 dan 150 mM). Penambahan sukrosa ini dilakukan untuk menentukan optimasi lisozim terhadap penambahan sukrosa pada konsentrasi yang berbeda selama tiga bulan penyimpanan pada kondisi suhu 4°C. Adapun pengujian yang dilakukan untuk menentukan aktivitas lisozim yaitu dengan metode turbiditas atau metode kekeruhan. Karakter atau kestabilan dari aktivitas lisozim pada serum otologus sebelum dan sesudah liofilisasi selama tiga bulan penyimpanan pada 4°C juga dilakukan menggunakan HPLC.

Bahan dan Metode

Penelitian ini menggunakan darah sukarelawan donor darah. Darah diambil dari tiga orang donor. Bahan-bahan yang digunakan adalah serum dan sukrosa. Bahan uji aktivitas lisozim adalah bakteri Gram positif *M. Lysodeikticus*, *reaction buffer*, 10 mL *folin-ciocalteu*, 0.67 g natrium karbonat, 0,05 g kupri sulfat, 0,05 BSA, 0,4 g natrium hidroksida dan 0,1 g natrium sitrat. Bahan untuk eluen HPLC yaitu pelarut asetonitril dan TFA. Adapun rancangan penelitian adalah studi komparatif dan uji non klinis. Sebanyak 100 mL darah diambil dari

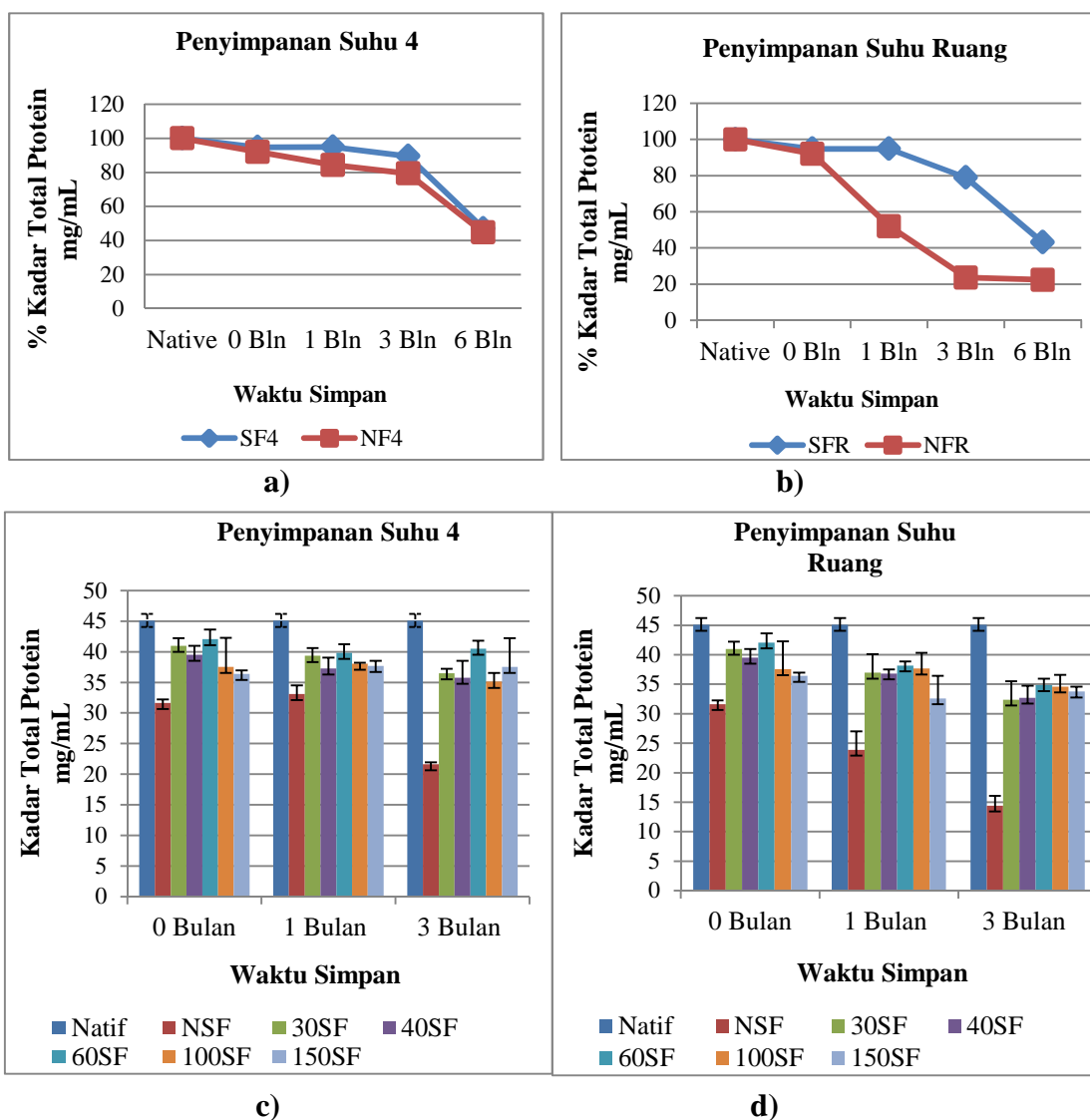
setiap donor, kemudian dilakukan *clotting* selama 2 jam, darah kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 5000 g. Serum yang diperoleh ±20 mL, serum diencerkan dengan natrium klorida fisiologis dengan perbandingan 1:4. Serum natif kemudian dianalisis untuk menentukan aktivitas lisozim dan karakter lisozim. Serum yang masih ada kemudian dibagi menjadi dua bagian yaitu tanpa penambahan sukrosa dan penambah sukrosa dengan variasi konsentrasi yang berbeda yaitu 30, 40, 60, 100 dan 150 mM. Serum kemudian dibekukan untuk pengerjaan liofilisasi. Pengerjaan liofilisasi sekitar 72 jam. Setelah proses liofilisasi, setiap sampel disimpan pada waktu 1, 3, dan 6 bulan penyimpanan pada suhu 4°C dan suhu ruang. Setiap 1, 3, dan 6 bulan masing-masing sampel dianalisis untuk menentukan aktivitas. Pengujian karakter lisozim dilakukan sampai penyimpanan tiga bulan. Fasa gerak HPLC menggunakan eluen A yaitu asetonitril 1%, air 98,8% dan 0,2% TFA. Eluen B yaitu asetonitril 70%, air 29,8% dan 0,2% TFA. Sebelum digunakan, eluen terlebih dahulu dionifikasi. Fasa diam menggunakan kolom C-18. Deteksi UV pada panjang gelombang 280 nm. Lisozim standar dilarutkan dengan *reaction buffer*, waktu retensi lisozim standar diatur sampai 30 menit, Sebanyak 20 µL sampel diinjeksikan ke dalam kolom. Lisozim pada sampel berada dalam retensi waktu 1,5 menit sesuai dengan lisozim standar yang berada diposisi tersebut. Penelitian ini menggunakan standar deviasi sebagai uji statistik.

Hasil

Pada penelitian ini juga dilakukan penentuan kadar total protein pada serum

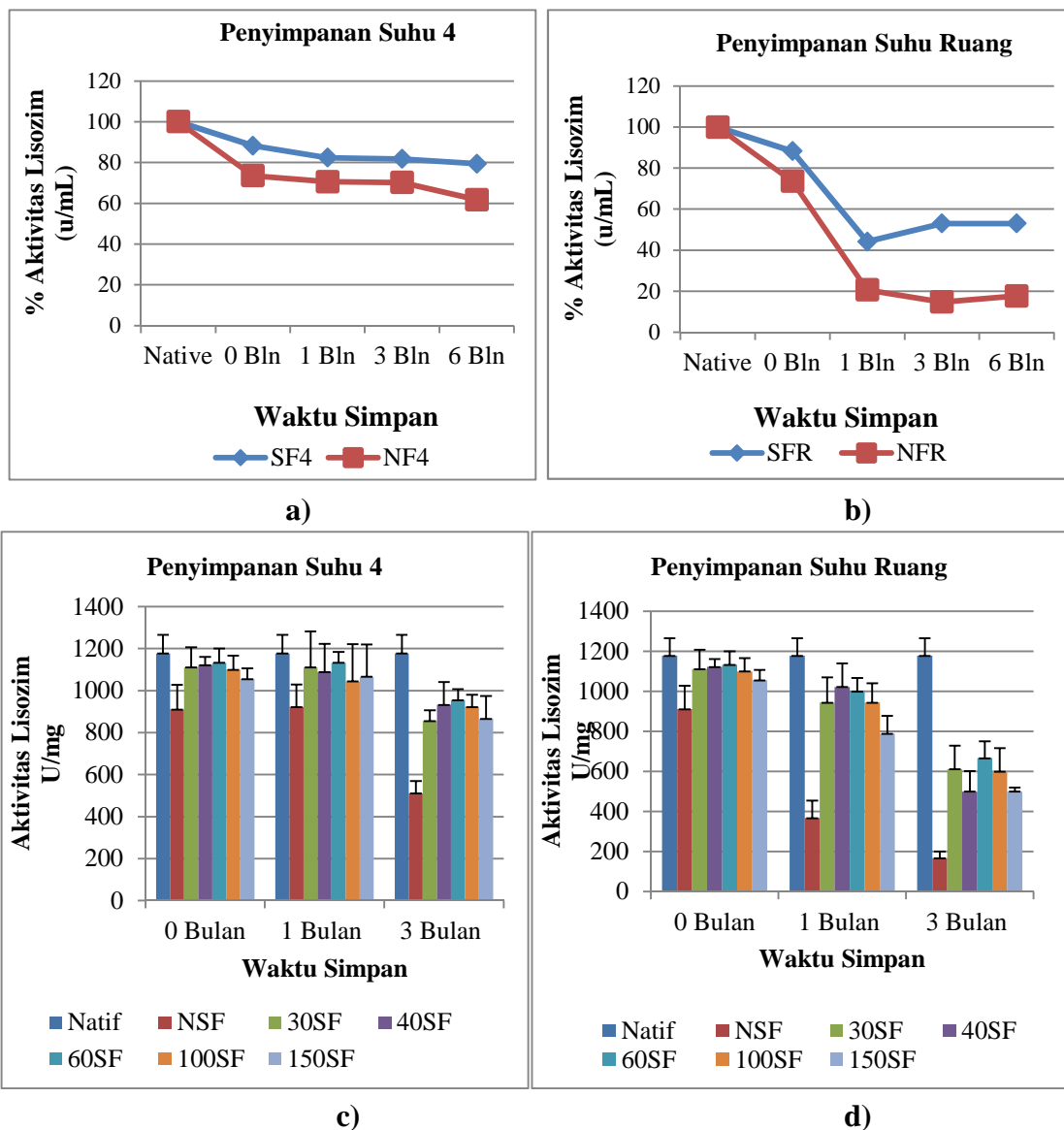
otologus dalam sediaan serbuk beku kering. Gambar 1, 2 dan 3 menunjukkan persentasi penurunan total protein, aktivitas lisozim dan aktivitas spesifik lisozim selama enam bulan penyimpanan (pola penurunan pada gambar ini mewakili kedua donor yang lain karena memiliki pola penurunan yang sama).

Gambar 1 Kadar Total Protein Berdasarkan Variasi Waktu, Suhu Simpan dan Variasi Sukrosa



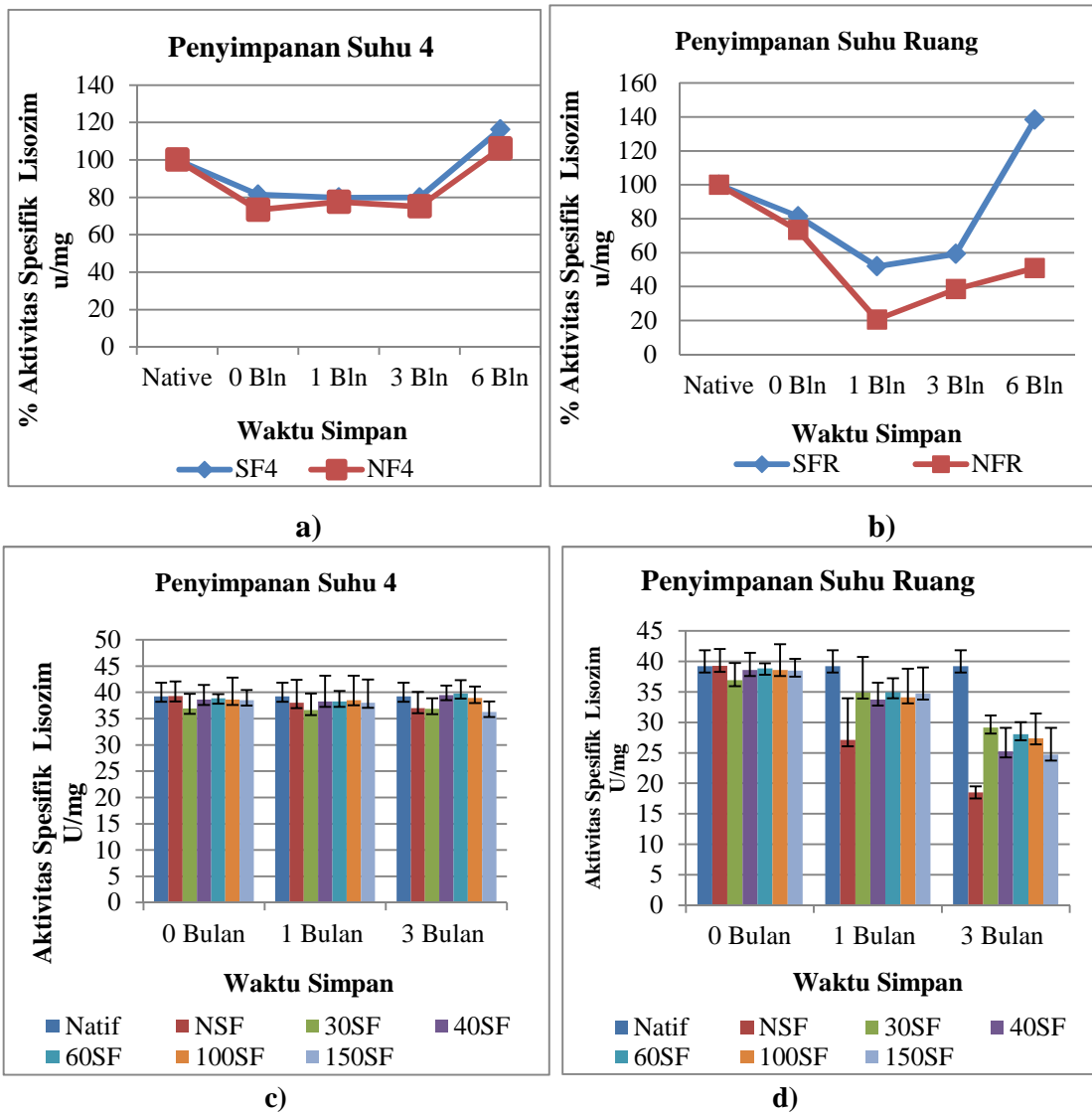
Ket: **a.** SF4 (serum serbuk beku kering dengan penambahan sukrosa pada suhu 4°C); NF4 (serum serbuk beku kering tanpa penambahan sukrosa pada suhu 4°C); **b.** SFR (serum serbuk beku kering dengan penambahan sukrosa pada suhu ruang); NFR (serum serbuk beku kering tanpa penambahan sukrosa pada suhu ruang); **c dan d.** Natif (tanpa penambahan sukrosa), 30SF (serum dengan penambahan 30 mM sukrosa), 40SF (serum dengan penambahan 40 mM sukrosa), 60SF (serum dengan penambahan 60 mM sukrosa), 100SF (serum dengan penambahan 100 mM sukrosa), 150SF (serum dengan penambahan 150 mM sukrosa).

Gambar 2 Aktivitas Lisozim Berdasarkan Variasi Waktu, Suhu Simpan dan Variasi Sukrosa



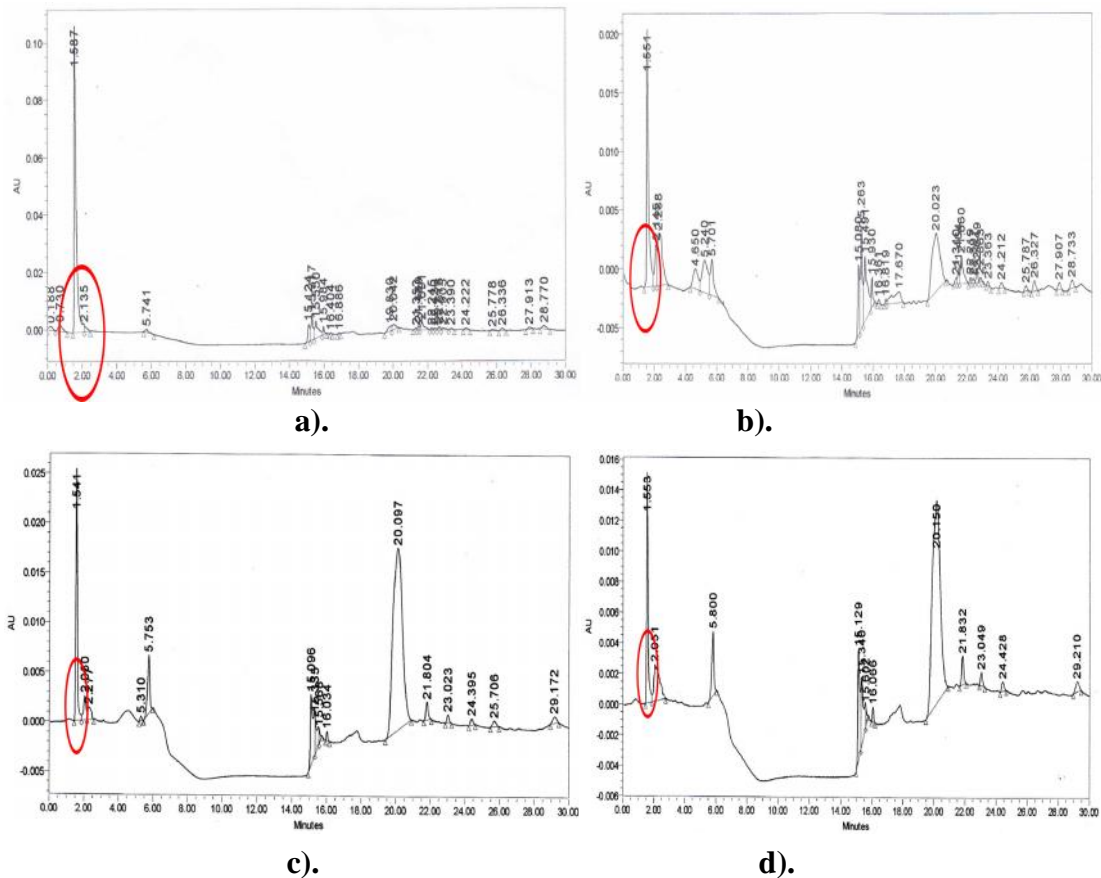
Ket: **a.** SF4 (serum serbuk beku kering dengan penambahan sukrosa pada suhu 4°C); NF4 (serum serbuk beku kering tanpa penambahan sukrosa pada suhu 4°C); **b.** SFR (serum serbuk beku kering dengan penambahan sukrosa pada suhu ruang); NFR (serum serbuk beku kering tanpa penambahan sukrosa pada suhu ruang); **c dan d.** Natif (tanpa penambahan sukrosa), 30SF (serum dengan penambahan 30 mM sukrosa), 40SF (serum dengan penambahan 40 mM sukrosa), 60SF (serum dengan penambahan 60 mM sukrosa), 100SF (serum dengan penambahan 100 mM sukrosa), 150SF (serum dengan penambahan 150 mM sukrosa).

Gambar 3 Aktivitas Spesifik Lisozim Berdasarkan Variasi Waktu, Suhu Simpan dan Variasi Sukrosa



Ket: **a.** SF4 (serum serbuk beku kering dengan penambahan sukrosa pada suhu 4°C); NF4 (serum serbuk beku kering tanpa penambahan sukrosa pada suhu 4°C); **b.** SFR (serum serbuk beku kering dengan penambahan sukrosa pada suhu ruang); NFR (serum serbuk beku kering tanpa penambahan sukrosa pada suhu ruang); **c dan d.** Natif (tanpa penambahan sukrosa), 30SF (serum dengan penambahan 30 mM sukrosa), 40SF (serum dengan penambahan 40 mM sukrosa), 60SF (serum dengan penambahan 60 mM sukrosa), 100SF (serum dengan penambahan 100 mM sukrosa), 150SF (serum dengan penambahan 150 mM sukrosa).

Gambar 3 dibawah ini menunjukkan karakter lisozim menggunakan HPLC.



Ket: (a) Hasil Kromatogram HPLC larutan standar 1000 ppm. Lisozim ditunjukkan pada waktu retensi 1,587; (b) Kromatogram HPLC Serum Natif. Lisozim ditunjukkan pada waktu retensi 1,551; (c) Kromatogram HPLC Waktu Simpan 3 Bulan. Serum serbuk beku kering dengan sukrosa 60 mM pada 3 bulan yang menunjukkan lisozim pada waktu retensi 1,541; (d) Kromatogram HPLC Waktu Simpan 3 Bulan. Serum serbuk beku kering tanpa sukrosa pada 3 bulan penyimpanan yang menunjukkan lisozim pada waktu retensi 1,553.

Tabel dibawah ini menunjukkan persen penurunan lisozim berdasarkan sifat hidrofobisitasnya menggunakan HPLC fasa terbalik.

Tabel 1 Persen Penurunan Lisozim Berdasarkan Sifat Hidrofobisitasnya Menggunakan HPLC

Sampel	Waktu	Luas Area	%
1000 ppm	1.587	881.911	-
Natif	1.551	182.293	100
60SF 3 Bulan	1.541	144.335	80
NSF 3 Bulan	1.553	93.476	51

Ket: 60SF (penambahan sukrosa 60 mM pada penyimpanan 3 bulan), NSF(tanpa penambahan sukrosa pada penyimpanan 3 bulan)

Pembahasan

Gambar 1.a menunjukkan penurunan kadar protein selama penyimpanan enam bulan pada suhu 4°C. Kadar protein pada sampel dengan penambahan sukrosa terjadi penurunan sekitar 60%. Sampel pada penyimpanan suhu ruang pada Gambar 1.b juga memiliki pola yang hampir sama dimana sampel dengan penambahan sukrosa terjadi penurunan 60%. Hal ini menunjukkan bahwa sukrosa berperan menjaga protein selama proses liofilisasi dan selama proses penyimpanan. Hal yang berbeda terlihat pada sampel tanpa penambahan sukrosa pada penyimpanan suhu ruang dimana terjadi penurunan protein lebih besar yaitu 80%. Penyimpanan suhu 4°C terlihat lebih sedikit. Hal ini menunjukkan bahwa faktor suhu yang rendah turut berperan menjaga kestabilan protein. Gambar 1.c dan 1.d menunjukkan penurunan total protein selama tiga bulan penyimpanan pada suhu 4°C dan suhu ruang pada sampel penambahan variasi konsentrasi sukrosa. Terlihat pada gambar bahwa stabilitas kadar protein yang terbaik ditunjukkan pada penambahan konsentrasi 60 mM.

Gambar 2.a menunjukkan penurunan aktivitas lisozim pada penyimpanan suhu 4°C yang relatif lebih stabil, terjadi penurunan sekitar 20% selama enam bulan penyimpanan. Sampel pada penyimpanan suhu ruang pada Gambar 2.b lebih besar sekitar 40%. Sampel tanpa penambahan sukrosa pada penyimpanan suhu ruang mengalami penurunan lebih banyak yaitu 80%. Sampel tanpa penambahan sukrosa pada suhu 4°C relatif lebih sedikit yaitu 40%. Hal ini menunjukkan bahwa suhu yang rendah turut berperan menjaga aktivitas lisozim. Gambar 2.c dan 2.d

menunjukkan penurunan aktivitas lisozim selama tiga bulan penyimpanan pada suhu 4°C dan suhu ruang pada sampel dengan variasi konsentrasi sukrosa. Terlihat pada gambar bahwa stabilitas aktivitas lisozim yang terbaik ditunjukkan pada penambahan konsentrasi 60 mM. Penurunan aktivitas lisozim pada sampel penambahan sukrosa maupun tanpa penambahan sukrosa yang disimpan pada suhu 4°C sejalan dengan penurunan karakter lisozim berdasarkan sifat hidrofobitasnya menggunakan HPLC yaitu sekitar 20% dan 50% untuk sampel tanpa penambahan sukrosa.

Gambar 3 menunjukkan persentase aktivitas spesifik lisozim. Gambar 3.a dan Gambar 3.b menunjukkan pola kenaikan aktivitas spesifik lisozim sampel dengan penambahan sukrosa pada penyimpanan enam bulan di suhu 4°C maupun pada suhu ruang. Hal ini menunjukkan bahwa kenaikan aktivitas spesifik lisozim terjadi akibat penurunan kadar protein-protein yang ada pada sediaan serum serbuk beku kering yang besar sementara aktivitas lisozim relatif stabil. Aktivitas lisozim teramati pada penyimpanan 4°C yang relatif lebih stabil. Pada penyimpanan suhu ruang terlihat aktivitas lisozim mengalami penurunan yang besar dibandingkan pada penyimpanan suhu 4°C, namun menurunnya total protein atau banyaknya protein yang mengalami agregasi menyebabkan aktivitas spesifik lisozim semakin meningkat pada bulan ke-6. Gambar 3.c dan 3.d menunjukkan penurunan aktivitas spesifik lisozim pada variasi konsentrasi sukrosa. Pada gambar tersebut terlihat bahwa 60 mM sukrosa merupakan konsentrasi optimum untuk menjaga aktivitas spesifik lisozim.

Aktivitas spesifik lisozim setelah penyimpanan mengalami penurunan sekitar 20 %.

Penambahan sukrosa

Liofilisasi merupakan proses yang penting dan mapan yang digunakan untuk meningkatkan stabilitas jangka panjang obat-obatan labil terutama dari golongan protein.⁸ Selain itu, juga memiliki keuntungan dalam hal mempermudah penanganan saat pengiriman maupun pada proses penyimpanan.⁸ Proses liofilisasi ini terdiri atas dua proses yaitu *freezing* atau pembekuan dan *drying* atau pengeringan dalam vakum. Molekul air yang dihilangkan melalui proses liofilisasi dapat mengurangi terjadinya degradasi protein baik secara kimiawi maupun fisika sehingga dapat menjaga kestabilan jangka panjang protein, namun pada proses dehidrasi ini juga dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan struktur protein yang pada akhirnya akan menyebabkan kesalahan pelipatan atau denaturasi dan agregasi protein ketika protein tersebut dilarutkan kembali ke dalam air.⁸⁻¹⁰ Agregasi protein adalah bergabungnya molekul-molekul kecil yang terjadi akibat pengaruh dari gaya pada interaksi protein.

Penambahan sakarida non pereduksi seperti sukrosa merupakan stabilisator yang dapat melindungi protein dari degradasi kimiawi dan fisis dalam larutan berair selama proses beku kering dan proses penyimpanan pada tahap selanjutnya.¹¹ Hal ini terjadi karena sukrosa dapat melindungi konformasi protein dalam padatan secara termodinamika melalui interaksi langsung seperti ikatan hidrogen yang menggantikan molekul air disekeliling molekul protein dan mengurangi

degradasi kimiawi protein secara kinetis dengan membungkus protein dalam lingkungan dengan mobilitas molekuler yang rendah dalam keadaan gelas.

Sediaan serum dengan penambahan variasi konsentrasi sukrosa yang berbeda yaitu 30, 40, 60, 100 dan 150 mM pada penyimpanan suhu 4°C maupun suhu ruang, terlihat bahwa protein dengan penambahan sukrosa 60 mM menunjukkan perlindungan stabilitas total protein maupun aktivitas lisozim yang lebih baik. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa 60 mM merupakan konsentrasi optimum untuk menjaga kestabilan protein selama proses liofilisasi dan penyimpanan.¹³⁻¹⁵ Sukrosa melindungi protein dengan interaksi langsung dimana protein dan konsentrasi sukrosa yang cukup untuk membentuk lapisan pada monomolekular permukaan protein untuk stabilisasi protein tersebut. Nilai terhadap perlindungan protein oleh gula non pereduksi yang berbeda akan menghasilkan perbedaan yang signifikan tergantung dari komposisi formula konsentrasi dan dari fisik stabilisator dan kompatibilitas dengan protein. Sakarida yang tidak efektif pada stabilisasi protein oleh gula bergantung dari panjang rantai glukosida serta panjang rantai interfasi terhadap intermolekular ikatan hidrogen dan kestabilan gula serta protein.

Protein dengan penambahan konsentrasi gula yang tinggi akan tahan terhadap proses liofilisasi dan proses penyimpanan yang dapat menginduksi denaturasi atau agregasi protein. Protein adalah polimer yang mekanismenya dapat digunakan untuk stabilisasinya sendiri. Interaksi antar protein dimer atau multimer dapat berkontribusi untuk menambah stabilitas pada konsentrasi, ini terlihat pada protein termofilik.

Penambahan konsentrasi sukrosa menentukan tingkat capaian limit stabilisasi untuk terjadinya destabilisasi selama liofilisasi. Contoh protein aktif stabil maksimal selama liofilisasi dengan penambahan 5% (w/v) sukrosa sedangkan penambahan sukrosa menjadi 10% (w/v) tidak menambah stabilitas protein secara signifikan.¹¹

Waktu penyimpanan

Liofilisasi protein dapat mengurangi aktivitas protein selama penyimpanan meskipun tetap stabil selama proses liofilisasi tersebut. Selama penyimpanan instabilitas dapat terjadi seperti agregasi, degradasi kimia seperti deamidasi, reaksi coklat, oksidasi, hidrolisis, dan perubahan formasi ikatan disulfida. Agregasi protein secara fisik dan kimia dapat terjadi selama penyimpanan. Agregasi fisik terjadi karena interaksi non kovalen. Agregasi kimia terjadi karena interaksi kovalen yaitu perubahan atau formasi ikatan disulfida. Berat molekul yang tinggi juga akan mempengaruhi denaturasi protein. Semakin berat molekul semakin mudah untuk denaturasi. Lisozim memiliki berat molekul 14,4 kDa dan memiliki empat ikatan disulfida. Hal ini tidak mudah menyebabkan terjadinya agregasi pada lisozim dengan perubahan ikatan disulfidanya.¹¹

Serum dalam sediaan serbuk beku kering dengan penambahan sukrosa yang disimpan setelah proses liofilisasi memiliki kadar yang lebih tinggi dibanding dengan serum serbuk beku kering tanpa penambahan sukrosa. Secara kasat mata sangat terlihat perbedaan antara sediaan yang ditambahkan sukrosa dengan tanpa penambahan sukrosa. Sediaan dengan penambahan sukrosa terlihat lebih

kekuningan sedangkan tanpa penambahan terlihat seperti serbuk putih yang kasar. Pada saat analisis juga terjadi perbedaan, dimana serum dengan penambahan sukrosa lebih cepat larut dibanding dengan serum serbuk beku kering tanpa penambahan sukrosa. Hal ini menunjukkan bahwa serum serbuk beku kering yang tanpa sukrosa mengalami denaturasi protein. Protein yang mengalami denaturasi, kelarutannya akan menjadi berkurang yaitu lapisan molekul pada bagian hidrofobiknya akan mengalami perubahan posisi dari dalam keluar maupun sebaliknya sehingga menyebabkan terjadinya perubahan kelarutan.

Perubahan suhu

Suhu pada penelitian ini memperlihatkan pengaruh yang cukup signifikan terhadap konsentrasi protein-protein pada sediaan serbuk beku kering serum otologus. Penyimpanan serum hasil liofilisasi pada kondisi suhu ruang mengalami penurunan kadar maupun aktivitas lisozim. Sedangkan pada suhu yang lebih rendah yaitu suhu 4°C protein tersebut relatif lebih stabil. Liofilisasi protein menunjukkan bahwa suhu merupakan faktor penting dalam penyimpanan. Temperatur yang tinggi akan menyebabkan berkurangnya aktivitas. Temperatur yang tinggi mempercepat agregasi fisik protein dalam keadaan padat. Hal ini dimungkinkan akibat bertambahnya interaksi mobilitas molekul protein pada temperatur tinggi yang memfasilitasi interaksi antar protein. Bertambahnya temperatur mempengaruhi protein secara tidak langsung. Suhu panas dapat merusak ikatan hidrogen dari protein tetapi tidak mengganggu ikatan

kovalennya. Hal ini dikarenakan meningkatnya suhu membuat energi kinetik molekul bertambah. Bertambahnya energi kinetik molekul akan mengacaukan ikatan-ikatan hidrogen. Naiknya suhu, akan membuat perubahan entalpi sistem naik. Selain itu bentuk protein yang terdenaturasi dan tidak teratur juga sebagai tanda bahwa entropi bertambah. Entropi sendiri merupakan derajat ketidakteraturan, semakin tidak teratur maka entropi akan bertambah. Pemanasan juga dapat mengakibatkan kemampuan protein untuk mengikat air menurun dan menyebabkan terjadinya koagulasi.¹¹

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa liofilisasi serum otologus selama enam bulan pada penyimpanan 4°C, menjaga lisozim lebih baik dibandingkan tanpa penambahan sukrosa. Sukrosa menjaga lisozim sampai 3,7 mg/mL dari lisozim natif 5.8 mg/mL. Nilai ini masih berada pada rentang kadar yang dapat digunakan. Diantara konsentrasi lioprotektan yang digunakan, sukrosa dengan penambahan konsentrasi 60 mM menunjukkan potensi terbaik menjaga protein selama proses liofilisasi dan selama tiga penyimpanan yaitu 4,8 mg/mL.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Rumah Sakit Mata Cicendo Bandung, yang telah membantu dalam pemberian dana pada penelitian ini. Terima kasih juga kepada responden yang dengan sukarela menyumbangkan sampel darah pada penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Geerling G. An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2005;243(7):706-14.
2. Quinto GG, Campos M, Behrens A. Autologous serum for ocular surface diseases. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2008;71:47-54.
3. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, *et al.* Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. *British Journal of Ophthalmology*. 1999 April 1, 1999;83(4):390-5.
4. Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *British Journal of Ophthalmology*. 2004 November 1, 2004;88(11):1467-74.
5. López-García J, García-Lozano I, Rivas L, Martínez-Garchitorena J. Use of autologous serum in ophthalmic practice. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 2007;82(1):9-20.
6. Koffler BH. Autologous Serum Therapy of the Ocular Surface with Novel Delivery by Platelet Concentrate Gel. *The Ocular Surface*. 2006;4(4):188-95..
7. Noble, B.A., R.S.K., Loh, S., MacLennan, K., Pseudovos, A., Reynolds, L.R., Bridges, J., Burr, O., Stewart & S., Quereshi. Comparison Of Autologous Serum Eye Drop With Conventional Therapy In A Randomize Controlled Crossover Trial For Ocular Surface Disease. *Br. J. Ophthalmol*. 2004; 88:647-652.

8. Tang X, Pikal M. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharmaceutical Research*. 2004;21(2):191-200.
9. Carpenter JF, Pikal MJ, Chang BS, Randolph TW. Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Some Practical Advice. *Pharmaceutical Research*. 1997;14(8):969-75.
10. Arakawa T, Timasheff SN. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*. 1982;21(25):6536-44.
11. Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;203(1-2):1-60.
12. Hermeling S, Crommelin D, Schellekens H, Jiskoot W. Structure-Immunogenicity Relationships of Therapeutic Proteins. *Pharmaceutical Research*. 2004;21(6):897-903.
13. Cleland JL, Lam X, Kendrick B, Yang J, Yang T-h, Overcashier D, *et al*. A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;90(3):310-21.
14. Enus S, Iman PM, Safri I, Toto S, Soetijoso S. Stabilisasi Tetes Mata Serum Otologus Dalam Sediaan Serbuk Dengan Metode *Freeze Drying* Menggunakan Lioprotektan. *Laporan Penelitian Pusat Mata Nasional Rumah Sakit Cicendo*; 2011.
15. Indrayati L. Stabilisasi TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor-Beta 1*), EGF (*Epidermal Growth Factor*) Dan Vitamin A Pada Tetes Mata Serum Otologus Dalam Sediaan Serbuk Kering Menggunakan Lioprotektan Sukrosa [Tesis]. Bandung: Magister Ilmu Kimia, Fakultas MIPA. Universitas Padjadjaran; 2014.