

Formulasi Dan Uji Pelepasan Pada Mikroemulsi Ovalbumin Sebagai Sistem Penghantaran Protein

Ida Kristianingsih¹, M. Yuwono², Esti Hendradi³

¹Fakultas Farmasi, Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata, Kediri, Jawa Timur

^{2,3}Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Jawa Timur

Corresponding author email : id_krist@yahoo.co.id

ABSTRAK

Mikroemulsi merupakan suatu sistem dispersi koloid antara air dan minyak yang stabil secara termodinamika dengan stabilisator surfaktan dan kosurfaktan. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan formulasi mikroemulsi sebagai sistem penghantaran protein berdasarkan pelepasan protein dengan menggunakan ovalbumin (OVA) sebagai model protein. Mikroemulsi dengan sistem w/o dibuat dengan perbandingan surfaktan (Span 80-Tween 80) dan kosurfaktan (butanol) yaitu 5:1, 6:1 dan 7:1. Semua formula memiliki sifat organoleptis yang sama yaitu (berwarna kuning, transparan dan memiliki viskositas rendah).

Uji pelepasan ovalbumin menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 584 nm. Reagen *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) digunakan untuk mendeteksi adanya ovalbumin. *Franz Diffusion Cell* dan membran selofan digunakan sebagai alat uji pelepasan. Kadar ovalbumin yang terlepas diukur dengan spektrofotometer UV-Vis dan dihitung sebagai presentase obat yang terlepas. Parameter pelepasan ovalbumin dihitung dengan mengukur AUC dan pelepasan yang tertinggi terdapat pada formula mikroemulsi 5:1. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa mikroemulsi dengan perbandingan 5:1 dapat digunakan sebagai alternatif untuk sistem penghantaran protein.

Kata kunci : mikroemulsi, ovalbumin, Span 80, Tween 80, butanol, release

ABSTRACT

Microemulsions are thermodynamically stable colloidal dispersions of water and oil stabilized by a surfactant and a cosurfactant. The aim of the present study was to develop microemulsion as a protein delivery based on proteins released by using ovalbumin (OVA) as a model protein. W/O microemulsion with the concentration ratio of surfactant (Tween 80-Span 80) cosurfactant (butanol) 5:1, 6:1, 7:1 were investigated. All formulation showed similarity organoleptic (yellow, transparent, low viscosity).

Ovalbumin release test were analyzed using UV-Vis spectrophotometric method at wavelength 584 nm. *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) were use detection of ovalbumin. *Franz diffusion cells* with the cellophane membranes were used. The amount of released OVA was measured with UV-spectrophotometric and the percentage of drug released was calculated. The highest AUC of released ovalbumin from microemulsion were formula 5:1. Based on the results obtained that the w/o microemulsion 5:1 could be used as a possible alternative to protein delivery system.

Keywords : microemulsion, ovalbumin, Span 80, Tween 80, butanol, release

PENDAHULUAN

Perkembangan sistem penghantaran obat memiliki dampak besar pada pengobatan berbagai penyakit (Fanun, 2012). Banyak penelitian mengenai sistem penghantaran saat ini difokuskan pada protein dan peptida (Graf *et al.*, 2008). Peningkatan penelitian protein ini disebabkan adanya pemahaman yang lebih baik pada peran protein dan peptida dalam pengobatan maupun pengembangan bidang bioteknologi dan sintesis biokimia (Reis *et al.*, 2006).

Peran protein dan peptida sebagai *biopharmaceutical* (*biodrug*) tidak tergantikan karena memiliki efek samping yang lebih sedikit dengan selektivitas dan kemampuan yang besar dalam pengobatan berbagai penyakit (Morishita & Peppas, 2006; Antasova *et al.*, 2009).

Salah satu protein yang digunakan pada penelitian adalah Ovalbumin (OVA). Selain sebagai model protein ovalbumin dikembangkan juga sebagai pembawa vaksin, pembawa protein lain (Mine *et al.*, 2003), *drug carrier* karena memiliki biokompatibilitas yang tinggi, aman dan relatif terjangkau (Zemser *et al.*, 1998). Ovalbumin adalah protein utama dari putih telur ayam dan merupakan glikoprotein dengan massa molekul 45000 Da (Nisbet *et al.*, 1981).

Ketersediaan OVA dalam jumlah besar menyebabkan penggunaannya meningkat sebagai standar dalam penelitian yang berkaitan dengan sistem penghantaran, struktur dan sifat protein (Huntington & Stein, 2001). Pada penelitian sebelumnya ovalbumin digunakan sebagai antigen dan bisa diantarkan dengan menggunakan sistem penghantaran verosom dan liposom (Bungener *et al.*, 2002), *microneedle array patch system* untuk penghantaran *intracutan* (Widera *et al.*, 2006).

Penelitian ini bertujuan mengembangkan formulasi mikroemulsi sebagai sistem penghantaran protein berdasarkan pelepasan protein. Ovalbumin dipilih sebagai model protein karena ovalbumin bisa dikembangkan sebagai pembawa vaksin, pembawa protein lain (Mine *et al.*, 2003) dan *drug carrier* (Zemser *et al.*, 1998). Ovalbumin memiliki biokompatibilitas yang tinggi, aman dan biayanya relatif terjangkau (Zemser *et al.*, 1998).

Ovalbumin memiliki BM sekitar 45.000 Dalton sehingga dibutuhkan suatu sistem penghantaran

yang bisa membawa ovalbumin hingga menembus kulit. Salah satu sistem penghantaran yang dikembangkan adalah mikroemulsi. Mikroemulsi dapat digunakan untuk menghantarkan senyawa yang bersifat lipofilik dan hidrofilik (Krielgaard, 2002). Mikroemulsi dapat memberikan hasil yang sangat baik dan dapat meningkatkan penetrasi obat dengan kapasitas *loading* obat tinggi dan memiliki efek *enhancer* (Krielgaard, 2002).

Berdasarkan uraian di atas dan hasil orientasi maka dibuat mikroemulsi dengan kadar surfaktan yang lebih rendah yaitu 38%. Minyak kedelai sebagai fase minyak, aqua bidestilata sebagai fase air, Span 80 dan Tween 80 sebagai surfaktan dan butanol sebagai kosurfaktan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Minyak kedelai *food grade* (PT. Moi Foods), Span 80 *analytical grade* (CRODA), Tween 80 *analytical grade* (CRODA), butanol *pro analysis* (Merck), Ovalbumin *pro analysis* (Sigma Aldrich), dan aqua bidestilata (PT. Widatra Bhakti) *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) (Sigma aldrich). Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini bila tidak disebutkan lain mempunyai derajat kemurnian *pharmaceutical grade*.

Metode Penelitian

Identifikasi Bahan Baku

Identifikasi kualitatif dilakukan pada ovalbumin dan minyak kedelai. Identifikasi ovalbumin sebagai bahan aktif yang meliputi identifikasi organoleptis dan pemeriksaan spektrum infra merah. Identifikasi kualitatif minyak kedelai meliputi identifikasi organoleptis, densitas dan indeks bias.

Pembuatan Formula Mikroemulsi

Mikroemulsi dibuat dengan perbandingan konsentrasi surfaktan (Tween 80-Span 80) dan kosurfaktan (butanol) 5:1, 6:1, 7:1. Komposisi mikroemulsi ovalbumin dapat dilihat pada Tabel 1. Pada awalnya, fase minyak dicampurkan dengan surfaktan dan kosurfaktan untuk menurunkan tegangan permukaan terlebih dahulu. Setelah itu diaduk sampai homogen dengan *magnetic stirrer*

dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Setelah homogen baru ditambahkan air sedikit demi sedikit sambil tetap diaduk dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit sampai terbentuk sistem mikroemulsi (tampilan jernih). Kemudian kecepatan pengadukan pada mikroemulsi ditingkatkan menjadi 1500 rpm selama 60 menit. Bahan aktif yang digunakan berupa ovalbumin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Identifikasi Bahan Baku

Pada tahap awal penelitian dilakukan identifikasi kualitatif terhadap bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian. Identifikasi ini dilakukan untuk menjamin bahwa bahan yang digunakan telah memenuhi persyaratan sesuai dengan pustaka. Identifikasi kualitatif dilakukan pada ovalbumin dan minyak kedelai. Identifikasi kualitatif diawali dengan pemeriksaan ovalbumin sebagai bahan aktif yang meliputi identifikasi organoleptis dan pemeriksaan spektrum infra merah. Hasil identifikasi ini menunjukkan bahwa ovalbumin yang digunakan sesuai dengan pustaka yaitu serbuk kuning pucat, tidak berbau dan agak higroskopis. Spektra infra merah ovalbumin juga menunjukkan hasil yang sesuai dengan pustaka (Rudra *et al.*, 2011; Khalil *et al.*, 2006).

Identifikasi kualitatif minyak kedelai meliputi identifikasi organoleptis, densitas dan indeks bias. Pada identifikasi organoleptis minyak kedelai didapatkan hasil yang sesuai dengan pustaka (Rowe *et al.*, 2009) yaitu cairan jernih kental, berwarna kuning dan tidak berbau. Identifikasi dari densitas minyak kedelai didapatkan $0,9188 \pm 0,0024 \text{ g/cm}^3$ pada suhu 20°C . Nilai ini sesuai dengan pustaka yaitu $0,916-0,922 \text{ g/cm}^3$ pada suhu 20°C (Rowe *et al.*, 2009).

Identifikasi densitas ini dilakukan untuk mengetahui kemurnian dari suatu zat, khususnya larutan dan juga dapat mempermudah dalam membuat formulasi karena dapat untuk menentukan bahwa suatu zat dapat bercampur dengan zat lain. Identifikasi terhadap indeks bias pada suhu 25°C didapatkan hasil $1,471 \pm 0,0005$ yang berarti sesuai dengan pustaka yaitu indeks bias minyak kedelai berkisar antara $1,471 - 1,475$ pada suhu 25°C (Rowe *et al.*, 2009).

Indeks bias merupakan perbandingan kecepatan cahaya dalam udara dengan kecepatan udara dalam zat tersebut yang juga digunakan untuk mengidentifikasi kemurnian suatu zat (Depkes RI, 1995). Berdasarkan data organoleptis dan indeks bias diatas maka dapat disimpulkan bahwa minyak kedelai sudah sesuai dengan pustaka. Dari keseluruhan identifikasi kualitatif yang dilakukan didapatkan bahwa bahan-bahan yang digunakan telah sesuai dengan spesifikasi sehingga dapat digunakan untuk penelitian.

Hasil Formulasi Mikroemulsi

Pada penelitian ini digunakan formula mikroemulsi sebagai sistem penghantaran ovalbumin karena mikroemulsi diketahui mampu menghantarkan peptida dan protein ukuran besar dengan BM 1000-150.000 Da (Russell-Jones & Himes, 2011). Formula mikroemulsi dibuat dengan tiga macam formula dengan perbandingan surfaktan (Span 80-Tween 80) dan kosurfaktan (butanol) yaitu 5:1, 6:1 dan 7:1.

Tabel 1. Komponen Sistem Mikroemulsi Ovalbumin

No	Bahan	Fungsi	Konsentrasi dalam formula (%) *		
			I	II	III
1	Ovalbumin	Bahan aktif	1	1	1
2	Minyak kedelai	Fase minyak	56,43	56,43	56,43
3	Span 80	Surfaktan	23,44	24,11	24,61
4	Tween 80	Surfaktan	7,91	8,14	8,31
5	Butanol	Kosurfaktan	6,27	5,37	4,70
6	Aqua bidestilata	Fase air	4,95	4,95	4,95

Perbedaan komposisi dari perbandingan surfaktan dan kosurfaktan bertujuan untuk melihat kemampuan pelepasannya. Konsentrasi surfaktan dan kosurfaktan harus tetap rendah untuk menjaga tidak terjadinya efek toksisitas (Bagwe *et al.*, 2001). Bahan aktif ovalbumin dimasukkan pada ketiga formula untuk mengetahui pengaruh surfaktan dan kosurfaktan pada kemampuan pengebakan dan pelepasan formula mikroemulsi, hal ini berdasarkan teori semakin besar konsentrasi zat terlarut maka fluks pelepasannya juga semakin tinggi (Martin *et al.*, 1993).

Pembuatan mikroemulsi pada penelitian ini berdasarkan hasil optimasi yang meliputi cara pencampuran maupun kecepatan pengadukan sehingga dapat menghasilkan mikroemulsi yang sesuai dengan spesifikasi. Pada awalnya, fase minyak dicampurkan dengan surfaktan dan kosurfaktan untuk menurunkan tegangan

80-Tween 80) dan Kosurfaktan (Butanol) 5:1, 6:1 dan 7:1 Sebelum dan Sesudah Penambahan Ovalbumin.

permukaan terlebih dahulu. Setelah itu diaduk sampai homogen dengan *magnetic stirrer* dengan

Formula	Replikasi	Evaluasi organoleptis					
		Sebelum ditambah OVA			Sesudah ditambah OVA		
		Bau	Warna	Bentuk	Bau	Warna	Bentuk
5:1	I	Khas	Kuning	Cairan kental jernih	Khas	Kuning	Cairan kental jernih
	II						
	III						
6:1	I	Khas	Kuning	Cairan kental jernih	Khas	Kuning	Cairan kental jernih
	II						
	III						
7:1	I	Khas	Kuning	Cairan kental jernih	Khas	Kuning	Cairan kental jernih
	II						
	III						

kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Setelah homogen baru ditambahkan air sedikit demi sedikit sambil tetap diaduk dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit sampai terbentuk formula mikroemulsi (tampilan jernih).

Pada penelitian ini bahan aktif ovalbumin dimasukkan setelah pembentukan formula mikroemulsi. Hal ini untuk menghindari supaya ovalbumin tidak kontak langsung dengan butanol yang kemungkinan dapat merusak rantai samping dari ovalbumin (Shimizu & Shimizu, 1999; Herskovits *et al.*, 1970).

Disisi lain mikroemulsi yang sudah jadi memiliki tegangan permukaan yang rendah yang diharapkan dapat meningkatkan kelarutan dari ovalbumin. Dari hasil pengamatan organoleptis didapatkan bahwa sebelum maupun sesudah penambahan ovalbumin didapatkan hasil yang hampir sama yaitu cairan kuning pucat, jernih, transparan dan berbau khas butanol. Hasil pengamatan organoleptis yang terdapat pada Tabel 2 ini sudah sesuai dengan spesifikasi mikroemulsi dari pustaka (Santos *et al.*, 2008).

Tabel 2. Hasil Karakterisasi secara Visual Formula Mikroemulsi dengan Perbandingan Surfaktan (Span

Pengujian pelepasan dilakukan dengan metode spektrofotometri *Visibel* menggunakan pereaksi CBB (*Coomassie Brilliant Blue*). CBB berikatan dengan protein dalam suatu larutan yang bersifat asam yang membentuk kompleks warna kebiruan kebiruan (Bradford, 1976). CBB sering digunakan dalam biokimia dan laboratorium klinik untuk pemurnian dan penetapan kadar protein. Penggunaan CBB untuk penetapan protein secara spektrofotometri UV-Vis juga umum dilakukan untuk penetapan kadar BSA (Katrachalli *et al.*, 2010).

Mekanisme pengikatan CBB dengan protein memiliki sensitivitas tinggi. Reaksi kompleks diduga terjadi pertama terdapat pada asam amino tertentu (Arginin, Lysin dan Histidin) dan kedua pada asam amino aromatik (Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin) yang berperan dalam pengikatan spesies anionik dengan protein. Ikatan CBB dengan protein juga terdapat pada interaksi hidrofobik dan ikatan *Van der Waals* antara protein dan spesies anionik dari CBB (Georgiou *et al.*, 2008). Reaksi CBB dengan protein dilaporkan tidak diganggu oleh kation dan anion logam, EDTA, karbohidrat, gliserol, TRIS, ammonia. Reaksi relatif cepat dengan reproduibilitas yang tinggi (Bradford, 1976).

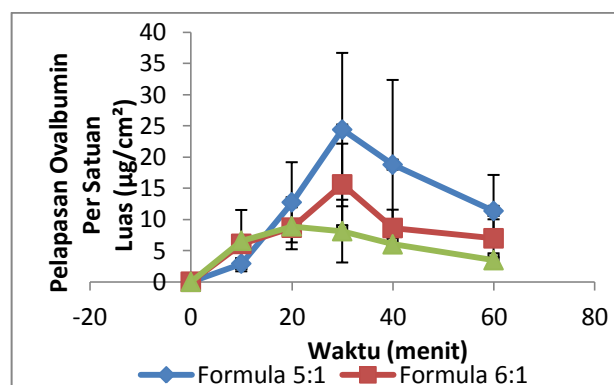
Pengujian linieritas dilakukan terhadap larutan baku ovalbumin pada panjang gelombang maksimum 584 nm. Kurva dibuat dari pengukuran absorbansi larutan baku kerja ovalbumin dalam aquabidestilata dengan CBB dalam rentang kadar 0,00-10,04 ppm. Dari hasil penentuan linieritas diperoleh persamaan regresi $y = 0,0218x + 0,0108$ dan koefisien determinasi $r^2 = 0,9983$ atau koefisien korelasi (r) = 0,9991. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang linier antara kadar dengan absorbansi ($r^2 \geq 0,997$) sehingga dapat digunakan sebagai kurva baku untuk perhitungan kadar selanjutnya (Gandjar & Rohman, 2013).

Sampel yang diambil terlebih dahulu dikoreksi Wurster yang bertujuan untuk mengurangi kesalahan dari resiko kehilangan kadar, akibat dari terlalu sedikitnya sampel yang diambil. Setelah didapatkan kadar yang sebenarnya setelah dikoreksi Wurster dibuat kurva hubungan antara kadar ovalbumin yang terlepas dalam media reseptor terhadap waktu. Waktu pelepasan pada hanya diambil satu jam karena setelah satu jam kadar ovalbumin yang terlepas sudah mengalami penurunan sehingga tidak didapatkan kondisi *steady state* seperti yang terdapat pada Tabel 3 dan Gambar 1. Berdasarkan teori, profil ovalbumin yang terlepas terhadap waktu akan mengalami kenaikan terus sampai didapatkan keadaan *steady state* (Martin *et al.*, 1993).

Terjadinya penurunan ini kemungkinan disebabkan karena air yang terdapat dalam kompartemen reseptor sudah tidak mampu untuk mengikat butanol yang terlepas sehingga butanol akan berikatan dengan ovalbumin yang terlepas yang menyebabkan rusaknya ikatan hydrogen pada struktur tersier dan sekunder dari ovalbumin. Ovalbumin yang sudah terdenaturasi ini tidak dapat berikatan kompleks dengan CBB yang menyebabkan jumlah ovalbumin yang terdeteksi menjadi lebih sedikit (Georgiou *et al.*, 2008; Shimizu & Shimizu, 1999; Herskovits *et al.*, 1970).

Tabel 3. Rerata Pelepasan Ovalbumin yang Terlepas Tiap Satuan Luas Membran pada Suhu 32°C dengan Kecepatan 100 rpm pada Formula Mikroemulsi

t (menit)	Rerata Pelepasan Ovalbumin yang Terlepas Per Satuan Luas Membran ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm SD		
	5:1	6:1	7:1
0	0	0	0
10	2,91 \pm 0,88	6,07 \pm 1,15	6,59 \pm 4,92
20	12,74 \pm 6,43	8,67 \pm 0,21	8,90 \pm 3,69
30	24,39 \pm 12,30	15,61 \pm 6,53	8,12 \pm 5,03
40	18,78 \pm 13,57	8,62 \pm 2,94	6,01 \pm 1,02
60	11,36 \pm 5,77	6,97 \pm 3,04	3,47 \pm 1,09



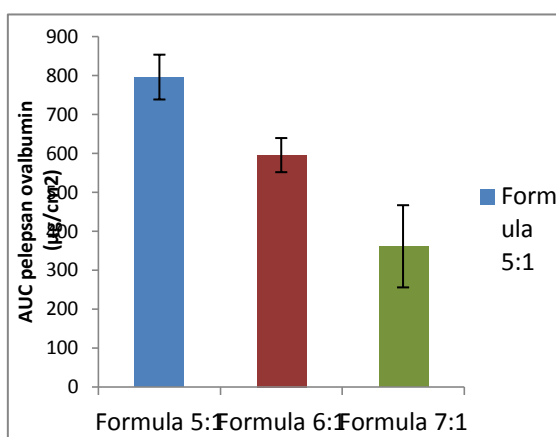
Gambar 1. Profil hubungan antara ovalbumin yang terlepas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pada berbagai formula vs waktu dalam media aqua bidestilata pada formula 5 : 1, 6 : 1 dan 7 : 1 suhu $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ dengan kecepatan pengadukan 100 rpm. Data merupakan rerata 3 kali replikasi \pm SD.

Grafik dari data pelepasan ovalbumin yang terlepas seperti pada Gambar 1, tidak dapat menggambarkan suatu garis linier, hal ini menyebabkan *slope* yang menggambarkan pelepasan ovalbumin tidak dapat dihitung sehingga digunakan parameter pelepasan yang lain yaitu AUC (*Area Under Curve*). Hasil perhitungan AUC dapat dilihat pada Tabel 4 dan Gambar 2.

Tabel 4. Harga AUC Pelepasan Ovalbumin yang Terlepas dari Formula Mikroemulsi pada Berbagai Formula dari Menit ke-0 hingga Menit ke-60

Replikasi	AUC pelepasan ovalbumin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)		
	. menit		
	5:1	6:1	7:1
I	771,05	551,77	264,30
II	754,59	594,55	345,04
III	861,53	639,43	473,66
Rerata \pm	795,72 \pm	595,25 \pm	360,99 \pm
SD	57,58	43,83	105,59
% KV	7,24	7,36	29,25

Dari hasil pengukuran didapatkan rata-rata AUC pelepasan ovalbumin berturut-turut yaitu formula 5:1 dengan nilai AUC ((795,720 \pm 57,579 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).menit), formula 6:1 dengan nilai AUC ((595,252 \pm 43,831 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). menit) dan formula 7:1 dengan nilai AUC ((360,998 \pm 105,589 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). menit) dan masing-masing formula dibuat replikasi 3 kali. Hasil AUC yang tertinggi terdapat pada formula 5:1 seperti yang terdapat pada Gambar 2. Tingginya kadar ovalbumin yang terjebak dalam formula 5:1 dibandingkan dengan formula 6:1 dan 7:1 ini juga berpengaruh terhadap pelepasan ovalbumin sehingga menghasilkan pelepasan yang lebih besar. Hal ini sesuai dengan teori dimana *fluks* pelepasan dipengaruhi oleh konsentrasi zat terlarut, semakin besar konsentrasi zat terlarut maka *fluks* pelepasannya juga semakin tinggi.



Gambar 2. Histogram harga rerata AUC pelepasan ovalbumin yang terlepas pada berbagai formula mikroemulsi mulai dari menit ke-0 hingga menit ke-60. Data merupakan rerata dari tiga kali replikasi \pm SD.

Berdasarkan analisis statistik metode *Anova Multivariant* (Manova), didapatkan signifikansi atau $p < 0,001 < 0,050$. Hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna antara ketiga formula

5:1, 6:1 dan 7:1 terhadap nilai AUC dalam formula mikroemulsi. Kemudian dilakukan uji LSD untuk melihat formula mana yang berbeda. Dari hasil uji LSD terlihat bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dari semua formula. Hasil ini sesuai dengan uji pengebakan yaitu pada perbandingan 5:1 adalah yang terbesar, sehingga pada uji pelepasan kadar ovalbumin pada 5:1 adalah yang tertinggi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat dibuat mikroemulsi ovalbumin dengan konsentrasi surfaktan (Tween 80-Span 80) dan kosurfaktan (butanol) 5:1, 6:1, 7:1. Mikroemulsi yang dibuat memiliki organoleptis yang serupa baik sebelum dan sesudah penambahan ovalbumin yaitu berpacairan kuning pucat, jernih, transparan dan berbau khas butanol. Kemampuan pelepasan ovalbumin, mikroemulsi dengan konsentrasi 5:1 memberikan AUC pelepasan ovalbumin yang paling besar.

PUSTAKA

- Antosova, Z., Mackova, M., Kral, V., and Macek, T., 2009. Therapeutic Application of Peptides and Proteins: Parenteral Forever?. **Trends in Biotechnology**, No.11, Vol.27, p. 628-635.
- Bagwe, R. P., Kanicky, J. R., Palla, B. J., Patanjali, P. K., and Shah, D.O., 2001. Improved Drug Delivery Using Microemulsion: Rationale, Recent Progress and New Horizons. **Critical Reviews in Drug Carrier System**, No 18, Vol. 1, p. 77-140.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. No.72, p. 248-254.
- Bungener, L., Huckriede, A., Wilschut, J., and Daemen, T., 2002. Delivery of Protein Antigens to the Immune System by Fusion-active Virosomes: A Comparison with Liposomes and ISCOMs. **Bioscience Reports**, No. 2, Vol. 22, p. 323 – 338.
- Departemen Kesehatan RI., 1995. **Farmakope Indonesia. Edisi IV**. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, p. 1030-1031.
- Fanun, M., 2008. A Study of The Properties of Mixed Nonionic Surfactants Microemulsion by NMR, SAXS, Viscosity and Conductivity.

- Journal of Molecular Liquids* 142, p. 10-110.
- Gandjar, I.G., and Rohman, A., 2013, **Analisis obat secara Spektrofotometri dan Kromatografi**, Yogyakarta: Penerbit Pustaka Pelajar, p. 59-119, 446-497.
- Georgiou, C. D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., Papapostolou, I., 2008. Mechanism of Coomassie Brilliant Blue G-250 Binding to Proteins: a Hydrophobic Assay for Nanogram Quantities of Proteins. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, p. 391-403.
- Graf, A., Jack, K.S., Whittaker, A.K., Hook, S.M., and Rades, T., 2008. Protein delivery using nanoparticles based on microemulsions with different structure-types. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 33, pp 434-444
- Herskovits, T.T., Gadegebeku, B., and Jaillet, H., 1970. On the Structural Stability and Solvent Denaturation of Proteins Denaturation by The Alcohols and Glycols. *Journal Of Biological Chemistry*. vol. 245, No.10, p . 2588-2598, 1970.
- Huntington, J.A., and Stein, P.E., 2001. Structure and Properties of Ovalbumin. *Journal of Chromatography Biochemistry*, 756, p. 189-196.
- Katrahalli, U., Kalanur, S.S., and Seetharamappa, J., 2010. Interaction of Bioactive Coomassie Brilliant Blue G with Protein: Insights from Spectroscopic Methods. *Scientia Pharmaceutica*, 78. p.869-880.
- Khalil, S.K.H., Allam, M.A., and Fatahalla, F.A. 2006. Application of FT-Raman Spectroscopy in the Quality Assurance/quality Control (QA/QC) of Drug. *Journal of Applied Sciences Research*. No. 2, Vol. 12, p. 1323-1329.
- Krielgaard, M., 2002. Influence of Microemulsions on Cutaneous Drug Delivery. *Advance Drug Delivery Reviews*, No.54, Vol 1, p. 77-98.
- Martin, A., Swarbrick, J., dan Cammara, A., 1993 **Farmasi Fisik: Dasar-Dasar Kimia Fisik Dalam Ilmu Farmasi**, Edisi ketiga Jilid kedua, Jakarta : Universitas Indonesia UI-PRESS, p. 830-835: 853-857.
- Mine, Y., and Rupa, P. 2003. Fine Mapping and Structural Analysis of Immunodominant IgE Allergic Epitopes in Chicken Egg Ovalbumin. *Protein Engineering*. No.10, Vol. 16, p. 747-752.
- Morishita, M., and Peppas, N.A. 2006. Is The Oral Route Possible for Peptide And Protein Drug Delivery. *Drug Discovery Today*, No 19, Vol 11, p. 905-910.
- Nisbet, A.D., Saundry, R.H., Moir, A. J.G., Fothergill, L.A., and Fothergill, J.E. 1981. The Complete Amino-Acid Sequence of Hen Ovalbumin. *European Journal of Biochemistry* 115, p. 335-345.
- Reis, C.P., Neufeld. R.J., Ribeiro, A.J., and Veiga. F., 2006. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and Current Status of peptide and Protein Nanoparticulate Delivery Systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2, p. 53-66.
- Rowe, C.R., Sheskey P.J Eds. 2009. **Handbook of Pharmaceutical Excipient**, 6th Ed. London: Pharmaceutical Press, p. 682.
- Rudra, A., Santra, K., and Mukherjee, B. 2011. Poly [D, L-lactide-co-glycolide] Microspheres as A Delivery System of Protein Ovalbumin Used as A Model Protein Drug. *Trend in Applied Science Research*. No. 6, Vol.1, p. 47-56.
- Russell-Jones, G., and Himes, R., 2011. Water-in-Oil Microemulsions for Effective Transdermal Delivery of Proteins. *Expert Opinion Drug Delivery*, p. 537-546.
- Santos, P., Watkinson, A.C., Hadgraft, J., and Lane, M.E. 2008. Application of Microemulsions in Dermal and Transdermal Drug Delivery. *Skin Pharmacology Physiology*, p. 246-259.
- Shimizu, S., and Shimizu, K., 1999. Alcohol Denaturation: Thermodynamic Theory of Peptide Unit Solvation. *Journal American Chemical Society*, 121, p. 2387-2394.
- Widera, G., Johnson, J., Kim, L., Libiran, L., Nyam, K., Daddona, P.E., and Cormier, M., 2006. Effect of Delivery Parameters on Immunization to Ovalbumin Following Intracutaneous Administration by a Coated Microneedle Array Patch System. *Vaccine* 24, p.1653-1664.
- Zemser, M., Gorinstein, S., and Friedman, M. 1998. The Structure-Function Relationship of Ovalbumin Matrix as The Result of Protein Denaturation (Short Communication). *Nahrung* 42, p. 252-253.