



PENGARUH RASIO KITOSAN DAN ATENOLOL TERHADAP DIAMETER UKURAN, EFISIENSI PENJERAPAN DAN PROFIL PELEPASAN PADA FORMULA MIKROSFER ATENOLOL DENGAN METODE EMULSIFIKASI

Ashri Almiahsari, Adeltrudis Adelsa Danimayostu, Dahlia Permatasari

Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

INFO ARTIKEL

Sejarah artikel:

Penerimaan naskah: 11 Agustus 2017
Penerimaan naskah revisi: 11 Desember 2018
Disetujui untuk dipublikasikan: 3 Januari 2019

Kata kunci :

Atenolol,
Emulsifikasi,
Hipertensi,
Kitosan, *Taste Masking*

ABSTRAK

Hipertensi merupakan penyakit dengan peningkatan tekanan darah lebih 140/90 mmHg di mana memerlukan terapi jangka waktu panjang. Hipertensi banyak dialami oleh geriatri yang cenderung sulit menelan tablet konvensional, sehingga modifikasi bentuk sediaan *fast disintegrating tablet* (FDT) diharapkan dapat mengatasi masalah tersebut. *Taste masking* merupakan aspek terpenting dalam akseptabilitas penggunaan FDT. Enkapsulasi mikrosfer termasuk salah satu teknik *taste masking* yang mampu menutupi obat dan menghindarkan kontak dengan *taste buds*. Polimer menjadi bahan utama enkapsulasi. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa pengaruh rasio kitosan dan atenolol terhadap diameter ukuran, efisiensi penjerapan, dan profil pelepasan mikrosfer atenolol dengan metode emulsifikasi dan mengetahui formula optimum berdasarkan diameter ukuran, efisiensi penjerapan, dan profil pelepasannya. Formula mikrosfer atenolol dibuat dengan rasio kitosan dan atenolol 1:0,5 (FI), 1:1 (FII), dan 1:1,5 (FIII). Karakterisasi mikrosfer yang dilakukan meliputi sifat alir, ukuran dan distribusi ukuran, efisiensi penjerapan, dan profil pelepasan. Berdasarkan hasil penelitian, efisiensi penjerapan tertinggi ditunjukkan pada FI dengan hasil sebesar $68,46 \pm 8,95\%$ yang berbeda signifikan berdasarkan analisis statistik ($p < 0,05$). Profil pelepasan yang paling tinggi juga ditunjukkan pada FI yaitu $73,162 \pm 4,507\%$ dalam 30 menit yang berbeda signifikan berdasarkan analisis statistik ($p < 0,05$). Kesimpulan penelitian ini adalah variasi rasio kitosan dan atenolol tidak berpengaruh signifikan terhadap sifat alir dan diameter ukuran mikrosfer, jumlah kitosan yang lebih tinggi menghasilkan efisiensi penjerapan dan persen pelepasan yang lebih besar, dan formula mikrosfer yang menghasilkan karakteristik fisik dan profil pelepasan yang optimum adalah formula dengan rasio kitosan dan atenolol sebesar 1:0,5.

THE EFFECT OF CHITOSAN AND ATENOLOL RATIO ON DIAMETER SIZE, ENTRAPMENT EFFICIENCY DAN RELEASE PROFILE OF ATENOLOL MICROSPHERE FORMULA WITH EMULSIFICATION METHOD

Keywords:

Atenolol,
Chitosan,
Emulsification,
Hypertension,
Taste Masking

ABSTRACT

Hypertension is a disease with elevated blood pressure more than 140/90 mmHg in which needed long term therapy. Hypertension is commonly suffered by geriatrics that tend to be difficult to swallow conventional tablets, modification of fast disintegrating tablet (FDT) is expected to overcome this problem. Taste masking is the most important aspect in acceptability. Microsphere encapsulation is one taste masking technique which is able to cover drugs and avoid with taste buds. Polymer is the main substance in encapsulation. This study aims to analyze the effect of chitosan and atenolol ratio on diameter size, efficiency entrapment, and release profile of atenolol microspheres by emulsification method and to discover formula optimum based on its diameter size, efficiency entrapment, and release profile. Atenolol microspheres formulated with the ratio of chitosan and atenolol were 1: 0,5 (FI), 1: 1 (FII), and 1: 1,5 (FIII). The microsphere characterization performed include flow characteristic, diameter size and distribution, efficiency entrapment, and release profile. The result showed the highest efficiency entrapment was shown in FI with $68,46 \pm 8,95\%$ which was significantly different based on statistical analysis ($p < 0,05$). The highest release profile was also shown in FI with $73.162 \pm 4.507\%$ in 30 minute with significantly different statistical analysis ($p < 0.05$). Based on the results, we can conclude that the variation of chitosan and atenolol ratio has no significant effect on flow characteristic and diameter of microsphere size, higher amount of chitosan result in greater efficiency entrapment and percentage release, and microsphere formula showed optimum characteristic is FI with chitosan and atenolol ratio 1: 0.5.

1. Pendahuluan

Hipertensi merupakan penyakit yang ditandai dengan peningkatan tekanan darah arteri secara persisten di atas 140/90 mmHg.¹ Hipertensi menyebabkan sekitar 45% kematian karena penyakit jantung yang banyak ditemukan pada usia 45 – 74 tahun.² Semakin bertambahnya usia, terjadi penurunan fungsi lidah dalam mencapai tekanan otot untuk melakukan pergerakan yang efektif, sehingga menyebabkan kesulitan menelan obat dalam bentuk sediaan padat.³ Beta bloker merupakan terapi antihipertensi lini pertama pada pasien dengan Penyakit Jantung Koroner (PJK).⁴ Atenolol merupakan obat golongan beta bloker selektif yang bioavailabilitasnya rendah (50%) serta memiliki rasa yang pahit.⁵ Hal ini dapat diatasi dengan sediaan FDT yang dapat hancur seketika di mulut. Sehingga mempermudah pasien saat mengonsumsi dan meningkatkan kepatuhan pasien geriatri dalam penggunaan obat.⁶ *Taste masking* merupakan suatu pertimbangan penting dalam merancang formula FDT, karena dapat meminimalkan kontak langsung zat aktif dengan *taste buds* sehingga rasa pahit obat tertutupi.⁷

Beberapa teknik *taste masking* diantaranya penambahan perasa dan pemanis, dispersi padat, resin penukar ion, dan metode enkapsulasi. Penambahan pemanis atau perasa tidak efektif dilakukan pada obat yang memiliki rasa sangat pahit.⁸ Oleh karena itu dikembangkan teknik *taste masking* dengan metode enkapsulasi, yaitu menjerap suatu zat aktif menggunakan polimer tertentu yang kelarutannya rendah pada saliva, sehingga dapat menutupi rasa pahit obat dan menghasilkan partikel dengan ukuran nano/mikro.⁹ Beberapa teknik enkapsulasi diantaranya *thermal crosslinking*, *ionotropic gelation*, *spray drying*, *fluidized bed coating*, dan metode emulsifikasi.¹⁰ Dari beberapa teknik tersebut, yang digunakan pada penelitian ini adalah metode emulsifikasi. Keuntungan dari metode tersebut adalah ukuran partikel yang dihasilkan lebih kecil dan lebih mudah saat dilakukan *scale up*.¹¹

Pada penelitian ini digunakan polimer kitosan yang tidak larut saat kontak dengan saliva (pH 7,4), sehingga diharapkan dapat menutupi rasa pahit atenolol. Untuk memperkuat penjerapan obat dengan kitosan digunakan *crosslinker* yakni sodium tripolifosfat (TPP). Penggunaan TPP dapat meningkatkan kekuatan mekanik mikrosfer.¹² Rasio obat dan polimer berpengaruh terhadap efektivitas *taste masking* dan pelepasan obat.¹³ Polimer kitosan yang digunakan untuk *taste masking* dicapai pada rasio obat dan polimer 1 : 1 dengan persen pelepasan obat sebesar 90,40% dalam waktu 25 menit.¹⁴

Optimasi formula mikrosfer atenolol perlu dilakukan untuk mengetahui rasio kitosan dan atenolol yang dapat menghasilkan diameter ukuran, efisiensi penjerapan dan profil pelepasan yang optimum, sehingga dapat digunakan sebagai pertimbangan dari aspek biaya pada saat melakukan formulasi. Oleh karena itu dilakukan penelitian terkait optimasi formula mikrosfer dengan atenolol sebagai model metode emulsifikasi menggunakan beberapa rasio kitosan dan atenolol. Dengan dilakukannya penelitian ini

diharapkan akan diketahui rasio kitosan dan atenolol yang menghasilkan karakteristik mikrosfer yang optimum.

2. Metode

Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasetika Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Farmasi Universitas Ma Chung. Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2016 sampai dengan Juni 2017.

Alat dan bahan penelitian

Alat yang digunakan selama penelitian adalah timbangan analitis (Shimadzu Uni Bloc), Spektrofotometer UV - Vis (Shimadzu 1800), pH meter (TOA DKK Model HM 30R), sonikator (SONIKA®), oven (Memmert UN 55), alat uji disolusi, *overheat stirrer* (IKA® RW 20 digital), dan pompa vakum (Vacuubrand®).

Bahan yang digunakan sebagai bahan penelitian adalah atenolol (PT. Kalbe Farma), kitosan, sodium tripolifosfat, asam asetat glasial, parafin cair (Merck), span 80, petroleum eter (Smart Lab), isopropanol alkohol (Merck), n – heksana (Merck), asam klorida (Smart Lab).

Formulasi Mikrosfer Atenolol

Pada penelitian ini terdapat tiga rancangan formula yaitu FI, FII, dan FIII. FI adalah formula mikrosfer kitosan – TPP yang mengandung atenolol dengan rasio kitosan dan atenolol adalah 1:0.5, FII menggunakan rasio kitosan dan atenolol adalah 1 1, dan FIII menggunakan rasio kitosan dan atenolol adalah 1:1.5 (Tabel 1)

Pembuatan Mikrosfer Atenolol

Metode yang digunakan dalam pembuatan mikrosfer atenolol adalah metode emulsifikasi yakni emulsi air dalam minyak berdasarkan Kumar, *et al.*, 2010 dengan melakukan optimasi lebih lanjut. Fase air terdiri dari larutan kitosan 3% b/v (dalam asam asetat 3% v/v) dan atenolol yang didispersikan didalamnya. Fase minyak terdiri dari parafin cair dan span 80 (1% b/v terhadap parafin). Fase air dimasukkan ke dalam ke dalam fase minyak sambil di aduk dengan menggunakan *overhead stirrer* dengan kecepatan 500 rpm selama 5 jam. Kemudian ditambahkan sejumlah petroleum eter dan isopropanol alkohol untuk menghilangkan atenolol yang tidak terjerap dan mengeraskan mikrosfer yang terbentuk. Kemudian disaring menggunakan pompa vakum, dan dikeringkan selama 24 jam pada suhu ruang. Setelah dikeringkan, mikrosfer dibilas menggunakan n – heksana untuk menghilangkan sisa-sisa minyak pada mikrosfer.

Evaluasi Mikrosfer Atenolol

Uji Laju Alir

Mikrosfer ditimbang sebanyak 100 gram, kemudian dituang ke dalam corong dengan kondisi bagian bawah corong yang tertutup. Kemudian tutup corong dibuka, dan dihitung waktu yang digunakan mikrosfer untuk mengalir menggunakan *stopwatch*.¹⁵ Laju alir dapat dikatakan baik jika mampu mengalir ≥ 10 g/detik.¹⁶

Uji Sudut Diam

Mikrosfer ditimbang sebanyak 100 gram, kemudian dituang ke dalam corong dengan kondisi bagian bawah corong yang tertutup. Tutup corong dibuka, dan mikrosfer dibiarkan mengalir. Sudut diam dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\tan \alpha = \frac{h}{r}$$

α adalah sudut diam, h adalah tinggi kerucut tumpukan serbuk (cm), dan r adalah jari-jari kerucut tumpukan serbuk (cm). Mikrosfer dapat mengalir dengan baik jika sudut diam < 35°. ¹⁷

Uji Efisiensi Penjerapan (EP)

Mikrosfer atenolol ditimbang 20 mg, digerus, dilarutkan dalam 10 ml metanol, kemudian didiamkan selama 24 jam. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Efisiensi penjerapan dapat dihitung sebagai berikut :¹⁸

$$EP (\%) = \frac{\text{Kandungan zat aktif}}{\text{kandungan zat aktif teoritis}} \times 100\%$$

EP adalah efisiensi penjerapan. Efisiensi penjerapan obat dengan mikrosfer atenolol yang dipersyaratkan adalah lebih dari 80%.¹⁹

Uji Penetapan Kandungan Atenolol dalam Mikrosfer

Mikrosfer atenolol ditimbang sebanyak 20 mg, digerus, dilarutkan dalam 10 ml metanol. Didiadakan selama 24 jam. Selanjutnya, diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 275 nm.¹⁸ Kandungan atenolol dapat dihitung sebagai berikut:

$$\text{Kandungan atenolol} = \frac{\text{berat atenolol terjerap}}{\text{berat mikrosfer total}} \times 100\%$$

Kandungan atenolol menunjukkan jumlah atenolol yang berhasil terjerap dalam total mikrosfer yang dihasilkan.

Uji Distribusi Ukuran Partikel

Uji ini dilakukan dengan metode *Laser Diffraction*, tepatnya dengan metode kering. Mikrosfer atenolol ditimbang sebanyak 5 gram, dimasukkan ke dalam tabung, dialiri dengan udara tekanan tinggi yang akan membawa ke *sensing zone*, kemudian ditembak dengan sinar laser sehingga terjadi hamburan cahaya. Distribusi dari intensitas mikrosfer yang dihamburkan ini akan dianalisis menggunakan komputer sebagai hasil distribusi ukuran partikel, hingga diperoleh nilai D10, D50 dan D90.²⁰ Lebar interval distribusi partikel dinyatakan sebagai *span value*, yang dapat dihitung menggunakan persamaan.²²

$$\text{Span value} = \frac{D90-D10}{D50}$$

Diameter rata - rata mikrosfer yang diinginkan berkisar 1 – 1000 μm ,²¹ dengan *span value* $\leq 2,5$.²²

Uji Pelepasan Atenolol secara *In vitro*

Uji disolusi mikrosfer atenolol dilakukan dengan cara memasukkan sejumlah mikrosfer (setara 100 mg atenolol) ke dalam media disolusi yaitu 900 ml HCl 0,1 N (pH 1,2) menggunakan apparatus 2 (metode dayung) dengan kecepatan 50 rpm selama 2 jam.¹⁶ Diambil cuplikan pada daerah pertengahan antara permukaan media dan daun dari alat dayung pada waktu pada menit ke 30, 60, 90, dan 120. Tidak kurang dari 1 cm dari dinding wadah. Buat koreksi

seperlunya dengan faktor koreksi lebih besar 25% dari kadar pada etiket tidak dapat diterima.²³ Kriteria penerimaannya yaitu dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 85%.¹⁶

Tabel 1. Komposisi Formula Mikrosfer Atenolol

Kode Formula	Kitosan (g)	Atenolol (g)	Crosslinker TPP (% b/v)	Asam asetat (% v/v)	Parafin cair (ml)	Span 80 (% b/v)
FI	6,67	3,33	4	3	555 ^(b)	1
FII	5	5	4	3	458 ^(b)	1
FIII	4	6	4	3	147 ^(b)	1

Keterangan:

Perbandingan polimer dan zat aktif pada FI (1 0,5), FII (1:1), dan FIII (1:1,5)

Parafin (ml) yang digunakan adalah 5:2 terhadap larutan kitosan

Uji Efisiensi Disolusi (*Dissolution efficiency/DE*)

Efisiensi disolusi ditentukan dengan menghitung luas area di bawah kurva disolusi pada waktu t yang diukur dengan metode trapesium dan luas bidang segi empat yang mendeskripsikan 100% obat terdisolusi di waktu yang sama.²⁴ DE dapat dihitung menggunakan persamaan:

$$DE_t (\%) = \int_0^t \frac{y \cdot dt}{y_{100,t}} \times 100 \%$$

DE adalah *dissolution efficiency*, $y \cdot dt$ adalah luas dibawah kurva pada waktu t , dan $y_{100,t}$ adalah luas bidang pada kurva yang menunjukkan 100% obat terlarut pada waktu t . Semakin tinggi efisiensi disolusi, dapat dikatakan bahwa bioavailabilitas obat semakin baik.²⁵

Analisis Data

Data hasil uji yang didapatkan kemudian dianalisis *One-way Anova* menggunakan SPSS 24, pada batas kepercayaan $\alpha = 0,05$. Selanjutnya untuk menguji adanya perbedaan teoritis dan trial dilakukan *Honestly Significant Difference Test* (HSD Test) atau uji HSD Tukey. Uji statistik parametrik *One-Way ANOVA* dan *Post-Hoc* untuk melihat ada atau tidaknya pengaruh yang signifikan pada beberapa variasi formula yang dikembangkan terhadap profil pelepasan, dan karakteristik fisik mikrosfer yakni ukuran, laju alir, sudut diam, dan efisiensi penjerapan sehingga didapatkan formula mikrosfer yang optimum.

3. Hasil dan Diskusi

Laju Alir

Laju alir pada FI, FII, dan FIII adalah sebesar 11,5587 \pm 0,9722 g/detik, 11,7637 \pm 1,1529 g/detik, dan 11,0839 \pm 0,0876 g/detik. Ketiga formula telah memenuhi spesifikasi (≥ 10 g/detik) dan dapat dikatakan mengalir dengan baik. Laju alir ketiga formula tidak memiliki perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) (Tabel 2)

Sudut Diam

Sudut diam pada FI, FII, dan FII adalah sebesar 15,9218 \pm 1,537°, 15,7660 \pm 3,941, 15,2529 \pm 0,512°, dan 15,2529 \pm 0,512°. Ketiga formula telah memenuhi spesifikasi (<35°) dan dapat dikatakan memiliki kemampuan mengalir yang baik. Sudut diam ketiga formula tidak memiliki perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). (Tabel 2).

Efisiensi Penjerapan

Efisiensi penjerapan FI, FII, dan FIII adalah 68,46± 8,95%, 62,82±10,09%, dan 46,20±4,83%. Ketiga formula tidak memenuhi spesifikasi, karena nilainya ≤ 80%. Efisiensi penjerapan ketiga formula menunjukkan perbedaan yang bermakna (p<0,05) (Tabel 3).

Tabel 2. Hasil Evaluasi Sifat Alir dan Distribusi Ukuran Mikrosfer Atenolol

Kode Formula	Laju Alir (g/detik)	Sudut Diam (°)	Diameter Ukuran (µm)	Span Value
FI	11,5588 ± 0,9722	15,9218 ± 1,537	391,75 ± 116,52	3,327 ± 2,988
FII	11,7536 ± 1,1529	15,7660 ± 3,941	399,15 ± 99,87	3,665 ± 4,453
FIII	11,0839 ± 0,0876	15,2529 ± 0,512	450,08 ± 11,65	1,753 ± 0,852

Tabel 3. Hasil Evaluasi Efisiensi Penjerapan dan Penetapan Kandungan Atenolol

Kode Formula	Efisiensi Penjerapan (%)	Kandungan Atenolol (%)
FI	68,46 ± 8,95	19,57 ± 3,42
FII	62,82 ± 10,09	27,19 ± 4,01
FIII	46,20 ± 4,83	32,47 ± 1,58

Kandungan Atenolol dalam Mikrosfer

Kandungan atenolol dalam mikrosfer pada FI, FII, dan FIII adalah 19,57 ± 3,42%, 27,19 ± 4,01%, 32,47 ± 1,58%. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa kandungan atenolol dalam mikrosfer yang paling tinggi ditunjukkan pada FIII, kemudian diikuti oleh FII, dan FI.

Distribusi Ukuran Partikel

Diameter rata-rata ukuran mikrosfer pada FI, FII, dan FIII adalah 391,75 ± 116,52 µm, 399,15 ± 99,87 µm, dan 450,08 ± 11,65 µm dengan span value sebesar 3,327±2,988; 3,665±4,453 dan 1,753±0,852. Diameter ukuran ketiga formula telah memenuhi spesifikasi (1-1000 µm) dan terdapat dua formula yang tidak memenuhi spesifikasi span value (≤ 2,5). Diameter ukuran pada ketiga formula tidak memiliki perbedaan yang bermakna (p>0,05) (Tabel 2).

Pelepasan Atenolol secara In vitro

Persen pelepasan atenolol pada FI, FII dan FIII di menit ke 30 secara berurutan adalah sebesar 73,162 ± 1,693%; 5,880 ± 0,462% dan 55,830 ± 0,092%. Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui bahwa persen pelepasan atenolol pada FI, FII, dan FIII tidak memenuhi spesifikasi. Spesifikasi terpenuhi jika jumlah obat yang terlarut untuk tiap unit sediaan tidak kurang 85% dalam 30 menit. Terdapat perbedaan yang bermakna pada FI (p<0,05), namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada FII dan FIII (p>0,05) (Tabel 4).

Efisiensi Disolusi (Dissolution efficiency/DE)

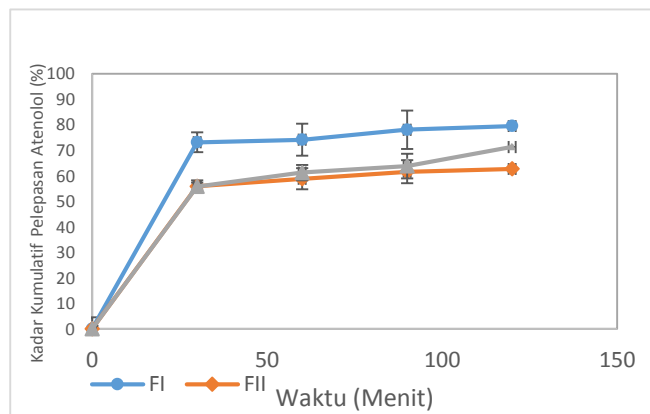
Berdasarkan hasil perhitungan efisiensi disolusi, didapatkan persen DE₁₂₀ pada FI, FII, dan FIII secara berurutan adalah 83,723 ± 6,506% ; 83,240 ± 3,607 %, dan 76,147 ± 3,739 %. Terdapat perbedaan yang bermakna pada FIII (p<0,05), namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada FI dan FII (p>0,05) (Tabel 5).

Tabel 4. Hasil Evaluasi Profil Pelepasan Atenolol

Formula	Menit ke-	Persen Pelepasan Kumulatif (%)
FI	30	73,162 ± 4,507
	60	74,162 ± 3,867
	90	78,069 ± 6,230
	120	79,532 ± 7,499
FII	20	55,880 ± 1,292
	60	58,851 ± 2,409
	90	61,619 ± 4,134
	120	62,701 ± 4,472
FIII	30	55,830 ± 1,106
	60	61,252 ± 1,517
	90	63,875 ± 2,973
	120	71,292 ± 4,828

Tabel 5. Hasil Evaluasi Efisiensi Disolusi Menit ke 120

Formula	DE ₁₂₀ (%)
FI	83,723 ± 6,506
FII	83,240 ± 3,607
FIII	76,147 ± 3,739



Gambar 1. Profil Pelepasan Atenolol

Pada penelitian ini difokuskan pada pembuatan dan karakterisasi mikrosfer sebagai alternatif *taste masking*. Karakterisasi pertama yang dilakukan ialah evaluasi sifat alir mikrosfer dengan menguji laju alir dan sudut diam bertujuan untuk mengetahui kemampuan mikrosfer mengalir. Hal ini akan berpengaruh pada mudah atau tidaknya mikrosfer tersebut mengalir dalam mesin cetak tablet saat dilakukan pengempaan. Pengaruh variasi kitosan dan atenolol tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna pada sifat alir.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Kondi dan Alluri (2015), dengan beberapa variasi rasio polimer dan obat menunjukkan bahwa perbandingan polimer dan obat tidak menunjukkan efek yang signifikan terhadap sifat alir.²⁶ Adapun penelitian yang dilakukan oleh Jain, et al. (2009), menunjukkan bahwa semakin kecil ukuran mikrosfer yang dihasilkan maka menunjukkan sifat alir yang lebih baik. Pada penelitian ini, mikrosfer yang dihasilkan memiliki bentuk seperti granula dengan diameter ukuran yang cenderung besar (±400 µm), sehingga kohesifitas antar

partikel rendah dan menghasilkan sifat alir yang baik. Namun tidak terdapat perbedaan sifat yang signifikan pada ketiga formula ($p > 0,05$).

Evaluasi lain yang dilakukan adalah uji efisiensi penjerapan yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan polimer kitosan untuk menyerap atenolol sebagai zat aktif. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa efisiensi penjerapan $FI > FII > FIII$, namun ketiga formula tidak memenuhi spesifikasi. Efisiensi penjerapan dapat dikatakan baik jika hasilnya $\geq 80\%$. Variasi rasio kitosan dan atenolol menunjukkan perbedaan efisiensi penjerapan yang signifikan pada ketiga formula. Hal ini membuktikan bahwa perbedaan rasio kitosan – atenolol memiliki pengaruh yang signifikan terhadap efisiensi penjerapan.

Dari hasil uji efisiensi penjerapan yang didapat menunjukkan bahwa persen efisiensi penjerapan tertinggi ada pada FI, diikuti FII, dan FIII. Perbedaan persen efisiensi penjerapan dapat dipengaruhi oleh perbedaan rasio kitosan dan atenolol yang digunakan. Rasio kitosan:atenolol yang digunakan pada FI, FII dan FIII secara berurutan adalah 1 : 0,5, 1 : 1, dan 1 : 1,5. Pada penelitian Pavanveena, *et al.* (2010), formulasi mikrosfer dengan rasio obat dan kitosan 1 : 1, 1 : 2, dan 1 : 3 menunjukkan bahwa persen efisiensi penjerapan tertinggi dihasilkan pada formula dengan rasio obat : kitosan 1 : 3, diikuti dengan formula 1 : 2 dan formula 1 : 1.²⁸ Hal tersebut menunjukkan bahwa rasio kitosan yang lebih besar dibandingkan atenolol menunjukkan persen efisiensi penjerapan yang paling tinggi jika dibandingkan dengan kedua formula lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak kitosan yang digunakan semakin tinggi efisiensi penjerapan yang terjadi dan semakin banyak obat yang digunakan akan semakin menurunkan efisiensi penjerapan. Menurut Hassan, *et al.* (1992), jumlah obat yang digunakan pada formulasi mikrosfer memiliki pengaruh yang signifikan terhadap efisiensi penjerapan. Semakin besar jumlah obat dapat berpengaruh pada semakin rendahnya efisiensi penjerapan. Hal tersebut dikarenakan semakin banyaknya konsentrasi obat yang digunakan pada formulasi mikrosfer dapat menurunkan kemampuan interaksi taut silang polimer dengan *crosslinker* sehingga terdapat sejumlah obat yang tidak berhasil terjerap.²⁹

Uji penetapan kandungan atenolol dalam mikrosfer yang bertujuan untuk mengetahui jumlah atenolol yang berhasil terjerap dalam total mikrosfer yang dihasilkan. Berdasarkan uji yang telah dilakukan, diketahui bahwa kadar atenolol yang terkandung pada FI, FII, dan FIII secara berurutan adalah sebesar $19,57 \pm 3,42\%$, $27,19 \pm 4,01\%$ dan $32,47 \pm 1,58$. Evaluasi yang dilakukan selanjutnya adalah uji distribusi ukuran partikel yang bertujuan untuk mengetahui kisaran ukuran dan penyebaran ukuran mikrosfer atenolol. Ukuran dapat berpengaruh pada laju pelepasan atenolol, semakin kecil ukuran partikel atenolol mikrosfer akan memperbesar luas permukaan partikel sehingga akan mempercepat mikrosfer untuk melarut. Berdasarkan Tabel 2, diketahui bahwa diameter ukuran mikrosfer pada $FIII > FII > FI$. Variasi rasio kitosan dan atenolol tidak berpengaruh signifikan terhadap diameter ukuran mikrosfer yang dihasilkan ($p > 0,05$).

Menurut Kilicarslan (2003), pada formulasi

mikrosfer dengan konsentrasi polimer yang sama, peningkatan jumlah obat yang terdispersi dalam polimer akan meningkatkan ukuran mikrosfer yang akan terbentuk. Hal ini disebabkan oleh peningkatan jumlah obat yang digunakan akan meningkatkan viskositas keseluruhan sistem sehingga akan menghasilkan mikrosfer dengan ukuran yang lebih besar.³⁰ Pada penelitian Biswal, *et al.* (2011) yang menggunakan rasio polimer dan obat sebesar 1 : 1, 1 : 2, dan 1 : 3, menghasilkan diameter mikrosfer yang dihasilkan secara berurutan adalah $123,53 \pm 6,37$; $132,76 \pm 11,81$; dan $167,40 \pm 13,08$. Hal tersebut menunjukkan bahwa diameter ukuran rata – rata partikel meningkat seiring dengan peningkatan jumlah obat yang digunakan.³¹ Namun berdasarkan hasil diameter ukuran mikrosfer yang didapat dengan menggunakan metode *laser diffraction*, variasi rasio kitosan dan atenolol tidak berpengaruh secara signifikan terhadap ukuran mikrosfer.

Distribusi ukuran mikrosfer ketiga formula yang dapat dilihat dari *span value*. *Span value* menunjukkan tingkat keseragaman dalam pola distribusi ukuran partikel. Pada umumnya, tidak ada batas penerimaan untuk *span value*, di mana hal tersebut bergantung pada tujuan dilakukannya pembuatan mikrosfer. Menurut Caetano, *et al.* (2016), distribusi ukuran dapat dikatakan sempit jika *span value* $\leq 2,5$.²² Pola distribusi yang sempit menunjukkan bahwa ukuran partikel homogen. Sedangkan pola distribusi yang lebar menunjukkan ukuran partikel yang heterogen. *Span value* FI dan FII tidak memenuhi spesifikasi dan menunjukkan bahwa distribusi ukuran mikrosfer yang dihasilkan tidak homogen. Berdasarkan hasil pengukuran, salah satu betas replikasi pada FI dan FII memiliki ukuran yang jauh berbeda dibanding dua replikasi lainnya.

Menurut Lusi (2011), prinsip pengukuran menggunakan *laser diffraction* dengan metode kering adalah dengan mendispersikan partikel menggunakan udara yang akan dibawa ke *sensing zone* dan ditembak menggunakan sinar laser, sehingga membentuk hamburan cahaya. Intensitas cahaya yang dihamburkan kemudian dianalisis secara komputerisasi sebagai hasil distribusi ukuran.²⁰ Berdasarkan *Malvern Instrumented Limited* (2016), distribusi ukuran partikel diproyeksikan berdasarkan variasi sudut intensitas cahaya yang dihamburkan oleh partikel saat ditembak menggunakan sinar laser. Partikel dengan ukuran yang lebih besar menghasilkan intensitas hamburan yang lebih tinggi dengan membentuk sudut yang relatif sempit. Sementara partikel yang lebih kecil menghasilkan intensitas hamburan yang rendah dengan membentuk sudut yang relatif lebar. Teori yang digunakan untuk menginterpretasikan data hamburan dalam sistem difraksi mengasumsikan bahwa sinar laser yang mengenai detektor dipancarkan oleh satu partikel. Terdapat kemungkinan sinar laser yang dihamburkan oleh lebih dari satu partikel atau yang disebut dengan *multiple scattering*. Peristiwa ini menyebabkan sinar laser dihamburkan membentuk sudut yang lebih lebar, yang diinterpretasikan sebagai partikel dengan ukuran yang lebih kecil.³² Oleh karena itu diperlukan pengamatan morfologi untuk memastikan adanya kemungkinan *multiple scattering*.

Uji pelepasan atenolol bertujuan untuk mengetahui

jumlah kumulatif atenolol yang terlepas dari mikrosfer dalam interval waktu tertentu. Berdasarkan hasil uji, dapat diketahui bahwa persen pelepasan atenolol pada FI, FII, dan FIII tidak memenuhi spesifikasi. Spesifikasi terpenuhi jika jumlah obat yang terlarut untuk tiap unit sediaan tidak kurang 85% dalam 30 menit. Variasi kitosan dan atenolol menunjukkan perbedaan yang bermakna pada pelepasan FI, namun tidak pada FII pada rasio kitosan dan atenolol memiliki pengaruh yang signifikan terhadap pelepasan mikrosfer atenolol.

Berdasarkan hasil uji pelepasan mikrosfer atenolol di menit ke 30, diketahui bahwa persen pelepasan FI > FII > FIII. Menurut Jelvehgari, *et al.* (2010), rasio polimer dan obat memiliki pengaruh terhadap pelepasan obat. Mikrosfer dengan rasio obat yang lebih banyak dibandingkan polimer menghasilkan tingkat pelepasan obat yang lebih tinggi dibandingkan formula dengan rasio polimer yang lebih banyak. Hal ini dikarenakan pada formula dengan rasio obat yang lebih banyak menghasilkan mikrosfer dengan dinding/matriks polimer yang lebih tipis, sehingga obat lebih mudah dilepaskan pada media uji pelepasan.³³ Pada mikrosfer dengan rasio polimer yang lebih banyak menghasilkan pembentukan dinding matriks polimer yang lebih tebal, sehingga pelepasan obat dari mikrosfer lebih lambat karena jalur difusi yang lebih panjang. Pada penelitian yang telah dilakukan, persen pelepasan obat yang paling tinggi ditunjukkan pada FI (1:0,5), diikuti dengan FII (1:1) dan FIII (1:1,5). Persen pelepasan obat yang paling tinggi ditunjukkan pada formula dengan rasio kitosan yang lebih banyak dibandingkan atenolol. Hal ini berlawanan dengan teori yang menyatakan bahwa mikrosfer dengan rasio obat yang lebih banyak dibandingkan polimer menghasilkan tingkat pelepasan obat yang lebih tinggi, seperti yang ditunjukkan pada penetapan kandungan atenolol di Tabel 3. Hasil pada tabel 3 sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Bodmier, *et al.* (1989), pada formula mikrosfer kitosan dengan sulfadiazine sebagai bahan aktif. Pelepasan sulfadiazine pada HCl 0,1 N semakin rendah seiring dengan peningkatan kandungan sulfadiazine pada mikrosfer tersebut.³⁴

Faktor lain yang dapat mempengaruhi pelepasan adalah ukuran mikrosfer yang dihasilkan. Berdasarkan hasil pengukuran menggunakan *particle size analyzer* (PSA) dengan metode *laser diffraction*, terlihat bahwa terdapat pola peningkatan diameter ukuran mikrosfer (FIII > FII > FI) walaupun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan berdasarkan analisis statistik. Ukuran diameter mikrosfer FI lebih kecil dibandingkan dengan FII dan FIII, mikrosfer dengan ukuran yang lebih kecil memiliki luas permukaan yang lebih besar, sehingga lebih cepat terlarut dan melepaskan atenolol yang terjepit, sehingga profil pelepasan FI > FII > FIII. Pada penelitian yang dilakukan oleh Jain, *et al.* (2009) juga menunjukkan pola pelepasan yang sama, di mana tiga formula mikrosfer dengan diameter ukuran sebesar $375,1 \pm 1,818 \mu\text{m}$, $378,7 \pm 2,914 \mu\text{m}$, dan $389,3 \pm 1,984 \mu\text{m}$, persen pelepasan tertinggi ditunjukkan pada formula dengan diameter ukuran yang paling kecil, diikuti dengan formula kedua dan ketiga.²⁷ Pada penelitian yang dilakukan oleh Gaur, *et al.* (2014) juga menunjukkan

bahwa semakin kecil ukuran mikrosfer maka pelepasan obat semakin besar. Diameter ukuran mikrosfer yang dihasilkan pada tiga formula adalah sebesar $629.9 \pm 7 \mu\text{m}$, $653.3 \pm 4.5 \mu\text{m}$, dan $686.2 \pm 5.8 \mu\text{m}$, dengan profil pelepasan tertinggi ditunjukkan pada formula pertama, kemudian diikuti dengan formula kedua dan ketiga.³⁵

Berdasarkan Tabel 3, dapat dilihat bahwa kadar atenolol terlarut menunjukkan peningkatan yang signifikan pada FI, FII, dan FIII di menit ke 30. Hal ini terjadi karena pelepasan atenolol yang sangat cepat. Pelepasan atenolol dapat dipengaruhi oleh morfologi dan ukuran mikrosfer. Pelepasan obat dari mikrosfer kitosan bergantung pada pH. Hal ini dikarenakan kitosan dapat larut pada kondisi asam ($\text{pH} < 6,5$), namun tidak larut pada kondisi basa atau netral.³⁶ Pelepasan atenolol yang tinggi pada menit ke 30 dikarenakan difusi media disolusi ke dalam mikrosfer yang terjadi dengan cepat pada saat mikrosfer kontak dengan media uji sehingga polimer kitosan mengalami *swelling* dan melepaskan sebagian besar obat dari mikrosfer, melalui jalur difusi dari pori – pori yang terbentuk. Hal tersebut merupakan efek yang menguntungkan karena berkontribusi pada semakin cepat tercapainya konsentrasi terapeutik obat dalam plasma sedangkan pelepasan atenolol pada menit 60, 90 dan 120 terjadi dengan lambat bahkan cenderung konstan, hal ini dapat dipengaruhi oleh mekanisme pelepasan obat yang sulit terjadi dikarenakan mikrosfer yang dihasilkan bersifat rigid / keras. Hal ini dapat dilihat setelah pengujian selama 2 jam, pada setiap *vessel* masih terdapat sebagian mikrosfer yang tidak terlarut sempurna, namun memang terlihat perubahan fisik yang terjadi pada mikrosfer tersebut. Mikrosfer yang awalnya berwarna coklat muda dengan dan memiliki tekstur yang keras, berubah menjadi agak transparan dan bertekstur agak sedikit keras. Menurut Nishimura, *et al.* (1991), kitosan merupakan polimer yang memiliki karakteristik struktur yang rigid/kaku, hal ini berkaitan dengan adanya gugus amin primer yang membentuk konformasi intramolekul/intermolekul melalui ikatan hidrogen.³⁷ Oleh karena itu, pelepasan atenolol setelah dua jam pun belum mencapai $\geq 85\%$.

Menurut Varma, *et al.* (2004), jenis polimer yang digunakan memiliki pengaruh terhadap pelepasan obat dari mikrosfer.³⁸ Kitosan terdiri dari beberapa jenis yang dapat diklasifikasikan berdasarkan, berat molekul dan derajat deasetilasi. Kitosan yang tersedia secara komersial memiliki derajat deasetilasi sebesar 66%-99% dan memiliki bobot molekul rata-rata 3,8 kDa dan 2000 kDa.³⁹ Kitosan dengan derajat deasetilasi yang relatif rendah (40%) dapat larut pada medium hingga pH 9, sedangkan kitosan dengan derajat deasetilasi sekitar 85% dapat larut pada medium hingga pH 6,5. Viskositas larutan akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi kitosan 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 yang tinggi. Semakin tinggi derajat deasetilasi maka kemampuan kitosan untuk mengembang semakin tinggi, karena gugus-gugus amino bermuatan positif semakin banyak, sehingga daya repulsif (tolak – menolak) antara gugus – gugus tersebut semakin

besar.⁴⁰ Derajat deasetilasi kitosan yang digunakan pada penelitian ini tidak dapat diketahui. Namun berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, kitosan pada penelitian ini tidak dapat larut pada kondisi pH 6,8, sehingga jika dibandingkan dengan teori di atas, dapat diketahui bahwa kitosan yang digunakan memiliki derajat deasetilasi yang tinggi.

Pada penelitian Guptda dan Jabrail (2008), mikrosfer kitosan dengan berat molekul rendah (260 kg/mol) dan derajat deasetilasi (DDA) yang rendah (48%) menghasilkan pelepasan yang lebih cepat dibandingkan mikrosfer kitosan dengan berat molekul tinggi (2227 kg/mol) dan DDA yang tinggi (75%). Hal ini disebabkan oleh kemampuan *swelling* kitosan. Kitosan dengan DDA tinggi memiliki kemampuan *swelling* yang lebih besar, sehingga jalur difusi yang terbentuk semakin panjang dan pelepasan obat berlangsung lebih lambat.⁴¹ Pada penelitian Nayak, *et al.* (2011), mikrosfer kitosan dibuat dengan metode emulsifikasi dengan menggunakan TPP sebagai *crosslinker*. Jenis kitosan yang digunakan pada penelitian ini adalah kitosan dengan derajat deasetilasi 85% dengan konsentrasi 3% b/v dan TPP 3% b/v dengan tujuan sebagai *sustained release*. Persen pelepasan yang didapatkan setelah 48 jam adalah sebesar $73.04 \pm 1,6\%$ dalam media dapar fosfat pH 7,4 dengan ukuran partikel sebesar $157,98 \pm 1,5 \mu\text{m}$.¹⁸ Adapun penggunaan kitosan sebagai polimer untuk *taste masking* sebelumnya telah dilakukan oleh Bora, *et al.* (2008) menggunakan metode *spray drying*. Jenis kitosan yang digunakan adalah kitosan dengan derajat deasetilasi 86,60%. Persen pelepasan yang dihasilkan adalah sebesar 90,40% dalam waktu 25 menit pada pH 1,2 dengan kisaran ukuran 1 – 10 μm sehingga dapat disimpulkan bahwa, kitosan dengan derajat deasetilasi yang tinggi (85%) dapat digunakan dengan tujuan pelepasan segera dengan mempertimbangkan metode pembuatan mikrosfer serta ukuran mikrosfer yang dihasilkan dari metode tersebut.¹⁴ Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, persen pelepasan atenolol tidak mencapai 85% dalam waktu 2 jam. Hal ini dapat dipengaruhi oleh diameter ukuran mikrosfer atenolol yang berkisar lebih dari 400 μm . di mana ukuran mikrosfer yang lebih besar akan dapat dikarenakan luas permukaan partikel yang kontak dengan media uji semakin kecil, sehingga akan terlarut cenderung lebih lambat.

Dari hasil persen pelepasan mikrosfer atenolol, dapat dihitung efisiensi disolusi dengan membandingkan laju disolusi antar formula mikrosfer atenolol yang dihasilkan. Berdasarkan hasil perhitungan efisiensi disolusi, didapatkan persen DE_{120} pada FI, FII, dan FIII secara berurutan adalah $83,723 \pm 6,506\%$; $83,240 \pm 3,607\%$, dan $76,147 \pm 3,739\%$. Berdasarkan analisis statistik, diketahui bahwa variasi rasio kitosan dan atenolol berpengaruh signifikan terhadap efisiensi disolusi ($p < 0,05$). Perbedaan yang bermakna ditunjukkan pada FIII, namun tidak pada FI dan FII. Diketahui bahwa $DE_{120} FI > FII > FIII$, di mana semakin tinggi efisiensi disolusi, dapat dikatakan bahwa bioavailabilitas obat semakin baik.

Pada penelitian ini tidak dilakukan uji efektivitas *taste masking* sehingga perbedaan pada ketiga formula tidak diketahui. Rasio polimer:obat dan ukuran partikel akan

mempengaruhi karakteristik *taste masking*. Menurut Aleksandra, *et al.* (2016), perbedaan rasio polimer dan obat memiliki pengaruh terhadap efek *taste masking*. Pada penelitian ini diprediksikan FI akan memiliki efek *taste masking* yang lebih baik dibandingkan dengan FII dan FIII. Pada formula dengan rasio polimer lebih banyak, *volunteer* tidak merasakan rasa pahit obat. Sedangkan pada formula dengan rasio polimer dan obat yang sama dan formula dengan rasio obat yang lebih banyak, *volunteer* dapat merasakan rasa pahit obat.¹³ Ukuran partikel juga berpengaruh pada efek *taste masking*. di mana semakin kecil ukuran mikrosfer, maka *mouth feel* semakin nyaman pada saat digunakan per oral.

Penentuan formula optimum dilihat dari profil pelepasan dan karakteristik fisik mikrosfer yang dihasilkan. Formula dikatakan optimum jika memenuhi spesifikasi yang telah ditetapkan yakni sifat alir yang dilihat dari uji laju alir dan sudut diam, ukuran dan distribusi ukuran mikrosfer, efisiensi penyerapan, serta profil pelepasan. Berdasarkan hasil analisis statistika, variasi rasio kitosan dan atenolol tidak berpengaruh secara signifikan terhadap sifat alir (laju alir dan sudut diam), ukuran dan distribusi ukuran. Berdasarkan parameter di atas, ketiga formula telah memenuhi spesifikasi yang telah ditetapkan. Berdasarkan hasil uji statistik yang menunjukkan bahwa rasio kitosan dan atenolol berpengaruh secara signifikan terhadap efisiensi penyerapan, profil pelepasan dan efisiensi disolusi. Efisiensi penyerapan ketiga formula tidak memenuhi spesifikasi, namun efisiensi penyerapan tertinggi ditunjukkan pada FI. Persen pelepasan ketiga formula tidak memenuhi spesifikasi, namun berdasarkan efisiensi disolusi diketahui bahwa FI memiliki persen DE_{120} yang paling tinggi. Sehingga dapat disimpulkan bahwa, formula optimum adalah FI dengan variasi kitosan dan atenolol sebesar 1:0,5.

4. Daftar Pustaka

1. Guyton AC, Hall JE. 2006. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 11*. Penerjemah: Irawati, Ramadani D, Indriyani F. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
2. American Kemenkes RI. 2013. *Gambaran Kesehatan Lanjut Usia di Indonesia : Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI*. Kemenkes RI. Jakarta
3. Stanley, Mickey dan Patricia Gauntlett Beare. 2006. *Buku Ajar Keperawatan Gerontik, Edisi2*. EGC. Jakarta
4. Pflieger, Matthew, Bradford T. Winslow, Kyle Mills, Ira M. Dauber. *Medical Management of Stable Coronary Artery Disease. American Family Physician*, 2011, 83 (7) : 819 – 826
5. Tripathi KD. *Essential of Medical Pharmacology*. 5th edn. Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd., New Delhi 2003; 129-130.
6. Koseki, T, H. Onishin, Y. Takahashi, M. Uchida and Y. Machida, Development of novel fast-dis-integrating tablets by direct compression using sucrose stearic acid ester as a disintegration-ac-celerating agent, *Chem. Pharm. Bull*, 2008, 56 : 1384–1388

7. Wagh V.D., Ghadlinge, S.V. Taste Masking Methods and Techniques in Oral Pharmaceuticals: Current Perspectives. *Journal of Pharmacy Research*, 2009, 2(6) : 1049-1054
8. Pokharkar, Versha B. Taste Masking Of Pharmaceuticals. *Indian J Pharm Sci*. April 2005.
9. Kumar T.M. Pramod, Manjanna, KM., Shivakumar B. Microencapsulation: An Acclaimed Novel Drug - Delivery System for NSAIDs in Arthritis. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2010, 27(6) : 501-532
10. Mitra, Analava and Baishakhi Dey. Chitosan Microspheres in Novel Drug Delivery Systems. *Indian J Pharm Sci*, 2011, 73(4) : 355-366.
11. Zuidam, N.J. and Shimoni, E. 2010. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. *In Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, N.J. Zuidam and V.A. Nedovic, editors. Springer, London, U.S.A., pp. 3-29.
12. Bhumkar, D.R. dan Pokharkar, V.B., 2006, Studies on Effect of pH on Crosslinking of Chitosan with Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note, *AAPS Pharm Sci Tech.*, 7(2), E1-E6
13. Aleksandra, Amelian, Marta Szekalska, Patrycja Ciosek, Anna Basa, Katarzyna Winnicka. Characterization and taste masking evaluation of microparticles with cetirizine dihydrochloride and methacrylate-based copolymer obtained by spray drying. *Acta Pharm*, 2016, 67 : 113-124
14. Bora, D, P Borude, K Bhise. Taste Masking by Spray-Drying Technique. *AAPS Pharm, Sci. Tech*. 2008. 9(4) : 1159-1164.
15. Lieberman HA, Lachman L, Schwartz. 1989. *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablet Volume 1*. Marcel Decker Inc, New York
16. The United States Pharmacopeial Convention. 2006. USP30-NF25. The United States Pharmacopeial Convention, United States of America
17. Gaisford, Simon, Mark Saunders. 2013. *Essentials of Pharmaceutical Preformulation*. John Wiley & Sons Ltd. United Kingdom
18. Nayak, Usha Y, Gopal V. Shavi, M. Sreenivasa Reddy. A. Karthik, Praful B. Deshpande, A. Ranjith Kumar, N. Udupa. Sustained release optimized formulation of anastrozole-loaded chitosan microspheres: in vitro and in vivo evaluation. *J Mater Sci: Mater Med*, 2011, 22 : 865-878
19. Thanoo, B.C., M.C. Sunny and A. Jayakrishnan, 1992. Cross-linked chitosan microspheres: Preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals. *J. Pharm. Pharmacol.*, 44: 283-286.
20. L. Lusi. Cara mengetahui ukuran suatu partikel,” *Nanotech Indonesia*. 28-Feb-2011.
21. Bao W, J. Zhou, J. Luo, D. Wu. *Journal of Microencapsulation*, 2006, 23 : 471-479
22. Caetano, Liliana A, Antonio J. Almeida, Lidia M.D. Goncalves. Effect of Experimental Parameters on Alginate/Chitosan Microparticles for BCG Encapsulation. *Mar. Drugs*, 2016, 14 (90) : 1 - 30
23. Depkes RI. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta : Ditjen Pengawasan Obat dan Makanan
24. Hurtado, FK, Raanello A, Torres BGS, Souto GD, Beck RCR, Rolim CMB. Development of a discriminating in vitro dissolution method for the poorly soluble drug rimonabant : Effect of Formulation Variables on Dosage Form Release Profiles. *Dissolution*. 2012 : 30 - 36
25. Júnior, Aníbal de Freitas Santos, Igor Santos Barbosa 1, Venyson Lima dos Santos, Rangel Leal Silva, Edimar Caetite Junior. Test of dissolution and comparison of in vitro dissolution profiles of coated ranitidine tablets marketed in Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 50 (1)
26. Kondi, Vanitha, Ramesh Alluri. Optimization And Evaluation Of Prazosin Hydrochloride Floating Microspheres Using Response Surface Methodology. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2015, 10 (3) Ver. II : 68 - 68
27. Jain AK, Jain CP, Buoyant Microspheres of Famotidine: An Approachable Dosage Form for Gastric Treatment, *J Young Pharm*, 2009, 1 : 20 - 23
28. Pavanveena, C., K Kavitha, SN Anil Kumar. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 2010, Vol 2 Issue 2.
29. Hassan, EE., Parish RC, Gallo JM. 1992. Optimized Formulation of Magnetic Chitosan Microsphere Containing the Anticancer agent, oxantrazole. *Pharm Res* 9 : 390 - 397
30. Kiliçarslan M1, Baykara T. The effect of the drug/polymer ratio on the properties of the verapamil HCl loaded microspheres. *Int J Pharm*. 2003, 252(1-2) : 99-109.
31. Biswal I. A Dinda, S. Mohanty, M Dhara, D. Das, K.A. Chowdary. Influence of Drug/Polymer Ratio on the Encapsulation Efficiency of Highly Hydrophilic Drug. *Asian Journal of Chemistry*, 2011, 23 (5) : 1973-1978
32. Malvern Instruments Limited. 2016. Top tips for avoiding particle sizing failures with your laser diffraction method. Grovewood Road, Malvern, Worcestershire, UK.
33. Jelvehgari, M., Nokhodchi, A., Rezapour, Valizadeh, H. Effect of Formulation and Processing Variables on the Characteristics of Tolmetin Microspheres Prepared by Double Emulsion Solvent Diffusion Method. *Indian J Pharm Sci*, 2010, 72 (1) : 72-78.
34. Bodmeier, R. Oh, K.H., Pkamar, Y. 1989. Preparation and evaluation of drug containing chitosan beads. *Drug development and industrial pharmacy*, 15: 1475-1494.
35. Gaur, Praveen Kumar, Shikha Mishra, Meenakshi Bajpai. Formulation and evaluation of controlled-release of telmisartan microspheres: In vitro/in vivo study. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2014, 22 (4) : 542-548
36. Rowe, Raymond C. Paul J. Sheskey, Sian C Owen.

2006. Handbook of Pharmaceutical Excipient. Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association, USA
37. Nishimura, S.I., Kohgo, O., Kurita, K. and Kuzuhara, H. (1991) Chemospecific manipulations of a rigid polysaccharide-syntheses of novel chitosan derivatives with excellent solubility in common organic-solvents by regioselective chemical modifications. *Macromolecules*, 24(17), 4745-4748.
 38. Varma, Manthena V.S., Aditya M. Kaushal, Alka Garg and Sanjay Garg. Factors Affecting Mechanism and Kinetics of Drug Release from Matrix-Based Oral Controlled Drug Delivery Systems. *Am J Drug Deliv* .2004. 2(1) : 43 – 57
 39. Sundar, S., Kundu, J., Kundu, SC, Biopolymeric Nanoparticles, *Sci. Technol. Adv. Mater*, 2010, 11 : 1-13
 40. Muzzarelli, R. V., Baldassare, F. Conti, P. Ferrara, dan G. Biagini. 1988. Biological Activity of Chitosan: Ultrastructural Study *Biomaterial*. 9:247-252.
 41. Gupta, K. C.,F. H. Jabrail. Effect of molecular weight and degree of deacetylation on controlled release of isoniazid from chitosan microspheres. *Polymers for Advanced Technologu*, 2008, 19 (5) : 432–441