

PREPARASI DAN KARAKTERISASI NANOPARTIKEL KITOSAN MENGANDUNG ANTIGEN INTI HEPATITIS B (HBcAg) DARI *Escherichia coli* BL21 (DE3)

M. Ikhwan Setiawan^{1*}, Chaidir², Deni Rahmat², Asrul Muhamad Fuad³

¹Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor,
Jalan Kumbang no. 23, Bogor, Indonesia, 16151

²Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta Selatan, Indonesia, 12630

³Pusat Rekayasa Bioteknologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jl. Raya Cibinong KM. 46,
Bogor, Indonesia, 16911

Korespondensi: ikhwan001@gmail.com

ABSTRAK

Hepatitis B Core Antigen (HBcAg) adalah antigen struktural dari virus hepatitis B yang berpotensi menjadi senyawa aktif dalam vaksin hepatitis B. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan produksi protein rekombinan hepatitis B core antigen (HBcAg) dalam *Escherichia coli*, dilanjutkan dengan pembuatan nanopartikel kitosan mengandung antigen HBcAg tersebut serta melakukan karakterisasi nanopartikel yang dihasilkan. HBcAg diproduksi dengan cara biosintesis protein rekombinan dari *Escherichia coli* BL21 (DE3) dengan variasi metode ekstraksi *Freezing-Thawing* (FT) dan Sonikasi (SO). Kisaran Bobot molekul dan profil kemurnian ekstrak protein diamati menggunakan SDS Page. Nanopartikel HBcAg disiapkan dengan metode gelasi ionik menggunakan *crosslinker* kitosan (CHI) dan *Sodium Tripolyphosphate* (STPP). Selanjutnya dilakukan karakterisasi terhadap nanopartikel yang dihasilkan meliputi morfologi, ukuran partikel, polidispersitas, profil pelepasan dalam larutan asam (pH 2,0) dan basa (pH 7,4) serta efisiensi penangkapan antigen. Karakterisasi protein dengan *SDS Page* menunjukkan bobot molekul protein berkisar 35-45 kDa serta ekstrak SO memiliki profil pita lebih bersih dan tebal dibanding ekstrak FT. Hasil analisis menggunakan *Particle Scanning Analyzer* menunjukkan bahwa ukuran nanopartikel terkecil sebesar 126,4 nm diperoleh dari perbandingan 2:1 kombinasi kitosan 0,1% dan STPP 0,1%, sementara kombinasi 5:3 menghasilkan keseragaman nanopartikel terbaik dengan indeks polidispersi 0,319. Stabilitas terbaik diperoleh dari kombinasi 2:1 kitosan 0,15% dan STPP 0,1% dengan nilai zeta-potensial 22,2 mV. Efisiensi penangkapan tertinggi sebesar 94,26% diperoleh pada rasio CHI 0,1% : STPP 0,1% sebesar 4:3. Uji pelepasan antigen *in vitro* menunjukkan bahwa pelepasan protein dari struktur nanopartikel lebih rendah dalam larutan asam dibandingkan dalam larutan basa.

Kata kunci: HBcAg, nanopartikel, protein rekombinan, vaksin

ABSTRACT

Hepatitis B Core Antigen (HBcAg) is a structural antigen of the hepatitis B virus with the potential to become an active compound in hepatitis B vaccines. This study aims to produce recombinant hepatitis B core antigen (HBcAg) protein in *Escherichia coli*, followed by the preparation of chitosan nanoparticles containing the HBcAg antigen, and to characterize the resulting nanoparticles. HBcAg is produced through the biosynthesis of recombinant protein from *Escherichia coli* BL21 (DE3) using variations of the *Freezing-Thawing* (FT) and *Sonication* (SO) extraction methods. The molecular weight range and purity profile of the protein extracts were observed using *SDS-PAGE*. HBcAg nanoparticles were prepared using the ionic gelation method with chitosan (CHI) and *Sodium Tripolyphosphate* (STPP) as crosslinkers. Characterization of the resulting nanoparticles included morphology, particle size, polydispersity, release profile in acidic (pH 2.0) and basic (pH 7.4) solutions, and antigen entrapment efficiency. Protein characterization

by SDS-PAGE showed a protein molecular weight range of 35-45 kDa, with the SO extract exhibiting a cleaner and thicker band profile compared to the FT extract. Analysis using a Particle Scanning Analyzer indicated that the smallest nanoparticle size of 126.4 nm was obtained from a 2:1 combination of chitosan 0.1% and STPP 0.1%, while the 5:3 combination resulted in the best nanoparticle uniformity with a polydispersity index of 0.319. The best stability was achieved from the 2:1 combination of chitosan 0.15% and STPP 0.1% with a zeta potential value of 22.2 mV. The highest entrapment efficiency of 94.26% was obtained with a CHI 0.1% : STPP 0.1% ratio of 4:3. In vitro antigen release tests showed that protein release from the nanoparticle structure was lower in acidic solution compared to basic solution.

Keywords: HBcAg, nanoparticle, recombinant protein, vaccine

PENDAHULUAN

Penyakit yang disebabkan oleh virus hepatitis telah menjadi perhatian utama global dan menyebabkan jutaan orang hidup terinfeksi secara kronis dengan virus hepatitis B (HBV) [1]. Secara struktural, Antigen Permukaan Hepatitis B (HBsAg) dan Antigen Inti Hepatitis B (HBcAg) adalah antigen utama dari virus hepatitis B [2] dan selama bertahun-tahun telah digunakan sebagai vaksin berbasis HBsAg untuk mengobati pasien penderita hepatitis B kronis (CHB). Namun demikian, ketidakmampuan untuk mengendalikan replikasi HBV dan/atau kerusakan hati adalah kekurangan dari vaksin berbasis HbsAg ini [3] sementara pada beberapa orang, respon imun yang diinduksinya tidak mencapai harapan [4].

Mencari target antigen dan hospes virus yang lebih baik menjadi perhatian utama penelitian anti-HBV saat ini [5]. Studi terbaru menunjukkan bahwa HBcAg memberikan peluang yang lebih baik untuk mengendalikan replikasi HBV dan mencegah kerusakan hati pada pasien CHB [6]. Vaksinasi HBcAg terhadap tikus dalam studi Jianqiang Li (2015) menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam tingkat HBcAb dibandingkan dengan vaksinasi HBsAg [7].

Beberapa metode digunakan untuk menghasilkan antigen, diantaranya protein rekombinan. Produk protein rekombinan yang diproduksi menggunakan *Escherichia coli*, memiliki keunggulan diantaranya biaya kultur yang rendah, tingkat ekspresinya tinggi, dan mudah untuk memodifikasi ke skala produksi yang lebih tinggi [8].

Sebagian besar sediaan vaksin diberikan melalui injeksi. Namun, vaksin injeksi memiliki keterbatasan dalam memberikan kekebalan mukosa. Sebagian besar kekebalan mukosa diperoleh melalui vaksinasi dengan rute oral atau nasal. Vaksinasi oral memiliki keunggulan dalam merangsang respons imun baik humoral

dan seluler [9]. WHO merekomendasikan vaksin jenis oral [10] karena tingkat kepatuhan yang lebih tinggi dibanding vaksin injeksi [11]. Namun keterbatasan stabilitas antigen dalam sistem penghantaran secara oral menjadi tantangan terbesar. Teknologi nanopartikel saat ini menjadi solusi untuk melindungi senyawa aktif dalam sistem penghantaran obat oral [9].

Kitosan diperoleh sebagai hasil dari deasetilasi kitin [12], dan diantaranya berasal dari cangkang udang [13]. Kitosan tidak larut dalam air tetapi larut dalam asam sementara garamnya larut dalam air. Sifat ini merupakan kunci penting untuk pembawa antigen vaksin oral. [14]. Nanopartikel kitosan cocok untuk penghantaran rute mukosa karena toksisitasnya rendah, sifat adhesifitas terhadap mukosa yang baik, serta sifat fisiknya yang dapat dimodifikasi [15].

Penelitian Mustopa (2017) berhasil melakukan transformasi dan ekspresi protein HBcAg dalam *E. coli*. Hasil karakterisasi oleh SDS Page menunjukkan berat molekul protein sekitar 38,5 kDa [16]. Namun, penelitian lebih lanjut masih diperlukan yang mengarah pada persiapan protein sebagai bahan baku untuk vaksin terutama vaksin oral, dengan memperhatikan stabilitas antigen dalam penghantaran obat ke lokasi target di saluran pencernaan.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai pembuatan nanopartikel kitosan yang mengandung antigen inti Hepatitis B (HBcAg) yang dibuat dengan metode rekombinasi protein pada *Escherichia coli* BL21 (DE3) serta melakukan karakterisasi pada nanopartikel yang dihasilkan.

METODE PENELITIAN

Bahan: Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur stok *Escherichia coli* BL21 (DE3) yang mengandung plasmid rekombinan pET32a yang telah disisipkan gen

pengkode HBcAg (koleksi Pusat Rekayasa Bioteknologi BRIN, Cibinong, Bogor, Indonesia), medium Luria-Bertani (LB), ampicilin, *isopropil β-D-tiogalaktopiranosida* Merck, Pierce™ BCA Protein Assay Kits ThermoFisher, Chitosan Sigma, *Sodium Tripolyphosphate* (STPP) Sigma

Alat: Vertical Electrophoresis Gel Unit Bio-Rad, Alat Sentrifugasi Kubota, Spektrofotometer UV-Vis merk Shimadzu, Inkubator merk Memmert, *Partikel Size Analyzer* Zetasizer nano ZSP.

Metode Produksi protein rekombinan HBcAg

Pekerjaan dimulai dengan melakukan prekultur *Escherichia coli* BL21 (DE3) yang mengandung plasmid rekombinan pET32a-HBcAg dalam 2,5 mL medium Luria-Bertani (LB) yang mengandung ampicilin (100 µg/mL), kemudian diinkubasi selama 18 jam dalam inkubator suhu 37 °C dalam goyangan 100 rpm.

Ekspresi protein dilakukan dengan metode Li *et al.* [7] dengan menginokulasi 2,5 mL prekultur *E. coli* ke dalam 100 mL media LB segar yang mengandung 100 µg/mL ampicilin. IPTG (isopropil β-D-tiogalaktopiranosida) ditambahkan ke dalam media sebagai induktor dengan konsentrasi akhir IPTG dalam medium kultur sebesar 0,1 mM. Selanjutnya diinkubasi selama 18 jam dalam inkubator bergoyang kecepatan 100 rpm suhu 28 °C. Hasil kultur disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit dan suhu 4 °C. Endapan biomasa dipisahkan untuk diekstraksi.

Endapan diekstraksi dalam larutan *lysis-buffer* menggunakan variasi metode ekstraksi (*freezing-thawing* dan sonikasi). Ekstraksi *freezing-thawing* dilakukan mengikuti metode Hecht [17] dengan membekukan sampel selama 2 menit dalam nitrogen cair dilanjutkan mencairkannya pada suhu 28 °C 15 menit. Dilakukan variasi jumlah siklus *freezing-thawing* yaitu 1, 3, 5, dan 10 siklus. Ekstraksi metode sonikasi dilakukan mengikuti metode Li *et al.* [18] menggunakan sonikator meliputi sonikasi 5 menit dan jeda 5 menit dalam air suhu 4 °C, dengan variasi siklus sonikasi 1, 3, 5, dan 10 kali sonikasi. Selanjutnya ekstrak disentrifugasi pada 12000 rpm selama 10 menit. Supernatan mengandung protein rekombinan dipisah untuk dikarakterisasi dan diproses menjadi nanopartikel.

Karakterisasi Protein Rekombinan

Protein dikarakterisasi dengan SDS-PAGE menggunakan gel akrilamida 3,9% (v/v) untuk stacking dan gel akrilamida 12% (v/v) untuk pemisahan. Sebanyak 10 µL protein dicampur dengan 10 µL SDS *loading buffer* dan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 10 menit. Sampel protein dan penanda dimasukkan ke dalam sumuran elektroforesis. Pewarnaan gel dilakukan dengan merendam dalam larutan *coomassie brilliant blue* R-250 selama 60 menit. Pewarna dihilangkan dengan melarutkannya dalam air suhu 100 °C selama 10 menit. Profil hasil SDS Page diamati dengan melihat pola pita protein yang terbentuk. Berat molekul protein target diprediksi dengan membandingkannya dengan berat molekul penanda. Analisis SDS Page lainnya dilakukan dengan menyertakan serangkaian pengenceran sampel *Bovine Serum Albumine* (BSA) dengan konsentrasi yang diketahui. Profil SDS yang terbentuk digunakan untuk mendapatkan perkiraan kualitatif konsentrasi protein yang dihasilkan dengan membandingkan profil pita sampel dengan standar BSA.

Pembuatan Nanopartikel Kitosan Mengandung Protein HBcAg

Serbuk kitosan dilarutkan dalam asam asetat 1% dan diaduk pada 1500 rpm untuk membuat larutan kitosan. Kemudian dibuat seri larutan kitosan: 0,3%; 0,15%; 0,1%; 0,05%; dan 0,025%. 100 µL protein ditambahkan ke 1 mL larutan kitosan dengan pengadukan pada 800 rpm selama 30 menit. STPP 0,1% ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam larutan kitosan sambil terus diaduk pada 800 rpm. Setelah seluruh volume STPP dimasukkan, pengadukan dipertahankan selama 15 menit. STPP sebagai titrator dibuat dalam volume 1 mL; 0,75 mL; 0,6 mL; 0,5 mL dan 0,4 mL. Evaluasi nanopartikel dilakukan untuk setiap seri perlakuan.

Karakterisasi dan Evaluasi Nanopartikel

Morfologi Nanopartikel

Morfologi nanopartikel diamati menggunakan mikroskop elektron (SEM).

Ukuran partikel, indeks polidispersitas, dan potensial zeta

Ukuran dan distribusi partikel, indeks polidispersitas, dan potensial zeta diamati menggunakan *Particle Size Analyzer* Zetasizer nano ZSP.

Efisiensi Penangkapan

Konsentrasi protein dalam sampel diukur menggunakan pereaksi *Bicinchoninic Acid* (BCA). *Bovine Serum Albumine* (BSA) digunakan sebagai standar protein. Sampel disiapkan dengan mencampur sampel protein dengan reagen BCA (1:20) dan kemudian diinkubasi dalam bak air pada suhu 60 °C selama 30 menit. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai serapan yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar (BSA) yang menunjukkan konsentrasi protein dalam sampel uji. Perbedaan jumlah antara muatan maksimum protein dan protein yang tidak terenkapsulasi ditentukan sebagai nilai efisiensi penangkapan.

Pelepasan Antigen Invitro

Pengukuran Pelepasan Antigen In Vitro mengikuti metode Chen et.al [20]. Dalam 2 botol, masing-masing disiapkan 12 mL larutan asam HCl 0,1M pH 2,0 dan 12 mL larutan basa *Phosphate buffered saline* (PBS) 0,1M pH 7,4. Suhu kedua larutan dipertahankan pada 37 ± 0,5 °C dalam pengaduk pemanas menggunakan bak air. Pada 2 mikrotube, ditambahkan 20 mikroliter gliserol, kemudian dimasukkan 1 mL larutan nanopartikel kitosan yang mengandung protein HBcAg dan dilanjutkan dengan ultrasonikasi pada 30000 rpm selama 10 menit. Bagian supernatan dihilangkan, dan sisa 0,75 mL disuspensikan dan diinkubasi dalam larutan asam atau basa yang telah disiapkan dalam botol di atas. Perlakuan dilakukan dengan memvariasikan waktu inkubasi dalam asam/basa. Setelah inkubasi, sampel sebanyak 1 mL diambil pada waktu 0; 0,5; 1; 3; 6; 10; dan 24 jam. Sampel dikentrifugasi pada 12000 rpm selama 10 menit dan diambil 0,3 mL supernatan untuk pengukuran protein menggunakan metode BCA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Virus hepatitis B adalah virus DNA dengan panjang genom 3,2-3,3 kilobase pasangan basa (kpb) [21]. Dalam penelitian ini, ekspresi protein rekombinan HBcAg menggunakan *E. coli* BL21 (DE3) dilakukan. Gen yang mengode enzim protease dalam *E. coli* BL21 telah dimutasi sehingga ekspresi protein rekombinan tidak terdegradasi secara intensif. Selanjutnya, protein yang diperoleh ditangkap ke dalam struktur nanopartikel kitosan dengan harapan memperoleh partikel protein yang lebih stabil, terutama dalam

kondisi asam dan basa yang menyerupai kondisi di saluran pencernaan manusia.

Produksi Protein Rekombinan

Dalam penelitian ini, sel inang *E. coli* BL21 (DE3) mengandung plasmid rekombinan (pET32a-HBcAg) yang mampu melakukan proses ekspresi protein HBcAg. Dalam plasmid pET32a ini, suatu penanda seleksi telah dimasukkan berupa gen resistensi terhadap antibiotik ampisilin, sehingga koloni bakteri yang tumbuh pada media Luria Bertani yang mengandung ampisilin dapat ditetapkan sebagai koloni transforman yang mengandung plasmid pET32a.

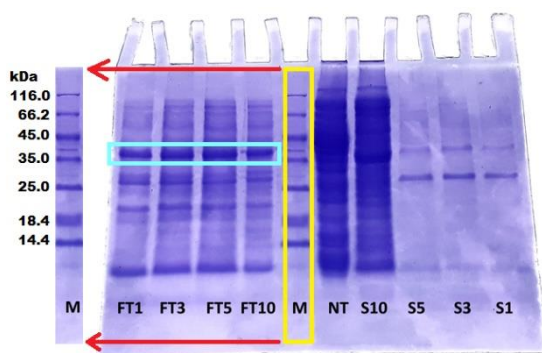
IPTG (*isopropil β-D-tiogalaktopiranosida*) ditambahkan sebagai induktor. Nilai kecil dari konstanta disosiasi IPTG terhadap repressor lac menyebabkan penurunan afinitas antara repressor lac dan operator IPTG, sehingga repressor akan mengikat ke operator dan menyebabkan RNA polimerase mengenali promotor dan dapat melakukan proses transkripsi gen [20]. Beberapa kekurangan IPTG sebagai induktor adalah harganya yang cukup mahal dan toksisitasnya yang tinggi [22].

Ekstraksi dan Pemisahan Protein Rekombinan

Ekstraksi protein dilakukan secara bersamaan dengan proses lisis sel menggunakan metode freezing-thawing dan sonikasi dalam larutan *lysis-buffer*. Lisis sel atau gangguan selular adalah metode untuk menghancurkan atau merusak batas luar atau membran sel dengan tujuan menarik atau melepaskan bahan-bahan yang terkandung dalam sel. [23]. Protein HBcAg adalah protein yang diproduksi dan disekresikan dalam sel sehingga tahap lisis membran sel diperlukan untuk mengisolasi protein tersebut.

Karakterisasi Protein Rekombinan

Protein rekombinan yang diekstraksi dikarakterisasi menggunakan SDS-Page. Dalam karakterisasi ini, pengamatan dilakukan terhadap perbedaan profil ekstrak yang dihasilkan dari metode *freeze-thawing* dan sonikasi. Penanda digunakan untuk menentukan rentang berat molekul pada setiap pita. Hasil SDS-page pada gambar 1 menunjukkan bahwa terdapat pita pada lokasi berat molekul antara 35 kDa dan 45 kDa. Hasil ini konsisten dengan data penelitian Mustafa, bahwa protein HBcAg memiliki berat molekul sekitar 38,5 kDa [16]



Gambar 1. Karakterisasi ekstrak protein dengan SDS Page

Hasil SDS page ekstrak protein pada Gambar 1 menunjukkan bahwa ekstraksi dengan metode *freeze-thawing* (FT1, FT3, FT5, FT10) menghasilkan protein rekombinan dengan konsentrasi yang lebih tinggi daripada hasil ekstraksi sonikasi (S1, S3, S5, S10), ditandai dengan profil pita *freeze-thawing* yang lebih tebal daripada metode sonikasi. Namun, metode sonikasi menghasilkan ekstrak yang lebih murni / bersih yang ditunjukkan dengan profil yang lebih ringan dengan sedikit pita di daerah berat molekul lainnya.

Preparasi Nanopartikel Protein Rekombinan

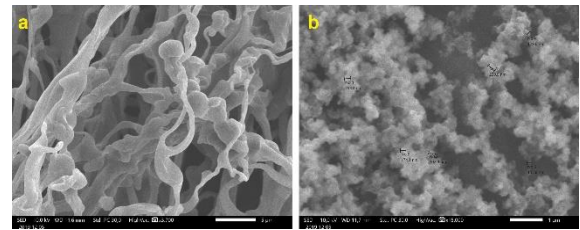
Nanopartikel protein disiapkan dengan metode gelasi ionik menggunakan polimer kitosan dan *Sodium Tripolyphosphate* (STPP) untuk membentuk ikatan silang. Mekanisme ini adalah ikatan silang ionik antara kitosan dan STPP [24].

Persiapan nanopartikel protein mengacu pada metode persiapan nanopartikel dari Calvo dkk. [25] dengan metode gelasi ionik di mana kitosan larut dalam pelarut asam asetat untuk membentuk larutan kitosan. Selanjutnya, sampel protein dilarutkan dalam larutan kitosan. Untuk membentuk nanopartikel, STPP ditambahkan secara perlahan ke larutan kitosan.

Evaluasi Nanopartikel Protein Rekombinan

Morfologi Partikel

Morfologi nanopartikel dapat dikarakterisasi dengan alat *Scanning Electron Microscope* (SEM). Bentuk partikel yang kurang sferis akan memudahkan kontak antara partikel yang mengakibatkan agregasi [26].

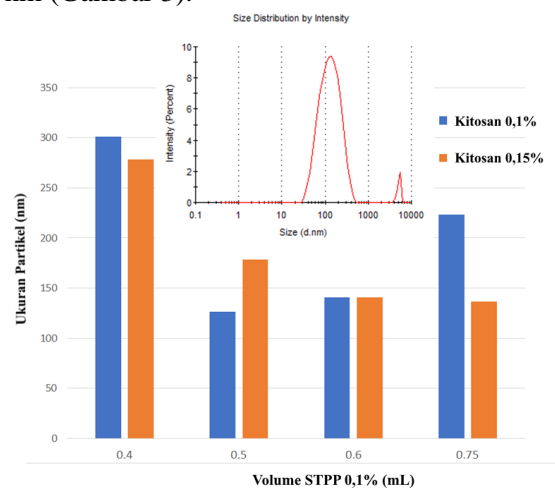


Gambar 2. Pengamatan nanopartikel protein rekombinan dengan SEM: a. bahan baku kitosan b. Nanopartikel kitosan mengandung HbcAg

Gambar 2 menunjukkan bahwa nanopartikel kitosan mengandung protein HBcAg yang secara morfologis berbeda dari bahan mentah kitosan asli. Partikel-partikel yang berkelompok terjadi karena kandungan kelembaban dari preparasi dengan *freeze-drying*. Namun demikian tampak butiran partikel dengan ukuran yang konsisten homogen.

Analisis Ukuran Nanopartikel

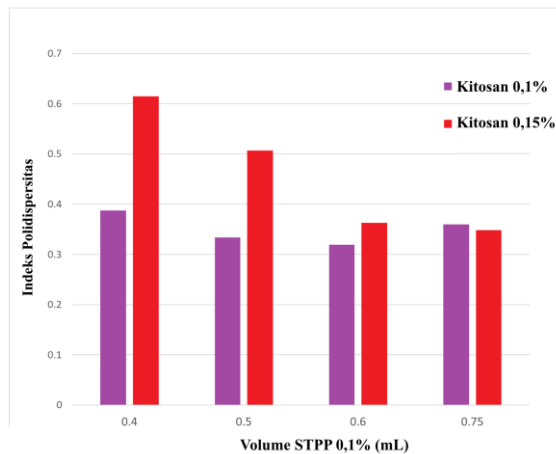
Hasil analisis *particle size analyzer* pada gambar 3 menunjukkan bahwa proses pembentukan partikel memberikan hasil optimal dengan rasio volume 1:0,5 mL (2:1) antara kitosan 0,1% dan STPP 0,1% dengan ukuran partikel yang dihasilkan sebesar 126,4 nm (Gambar 3).



Gambar 3. Diagram analisa ukuran partikel protein rekombinan

Indeks polidispersitas (pdi) menggambarkan tingkat keseragaman distribusi ukuran partikel. Polidispersitas dapat terjadi karena distribusi ukuran dalam sampel, proses aglomerasi, atau proses agregasi sampel selama isolasi atau analisis. Organisasi standar internasional (ISO) menetapkan bahwa nilai indeks polidispersitas <0,05 lebih umum untuk sampel monodispers, sedangkan nilai >0,7 umum untuk distribusi ukuran partikel yang luas [27]. Nilai pdi > 0,05

dan <0,7 pada gambar 4 menunjukkan tingkat keseragaman yang moderat. Rasio volume 1:0,6 antara kitosan 0,1% dan STPP 0,1% dapat



Gambar 4. Grafik indeks polidispersitas nanopartikel protein rekombinan

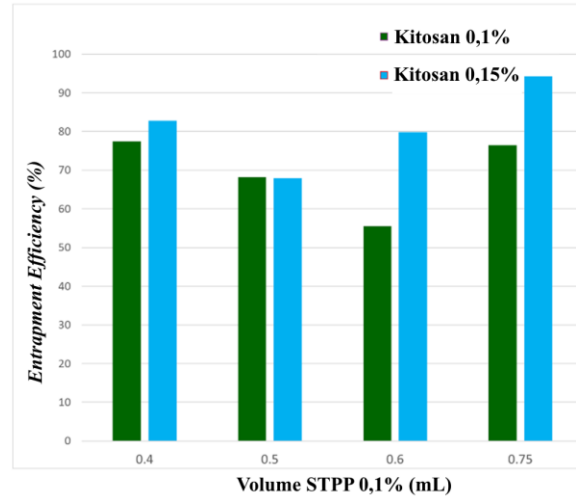
Sifat farmakokinetik dari sistem nano di dalam tubuh dapat dipengaruhi oleh nilai potensial zeta partikel [27] yang dapat berkontribusi pada efektivitas obat berbasis nanopartikel [28]. Gambar 5 menunjukkan kombinasi kitosan 0,15% dan STPP 0,1% dengan rasio volume 1:0,5 memberikan nilai potensial zeta tertinggi. Dengan potensial zeta yang tinggi, stabilitas partikel akan lebih baik. Nanopartikel dengan potensial di atas (+/-) 30 mV terbukti lebih stabil dalam suspensi, karena muatan permukaan mencegah agregasi partikel [29]. Secara umum, konsentrasi kitosan 0,15% memiliki efisiensi penyerapan yang lebih tinggi dalam menyerap protein rekombinan dalam matriks nanopartikel (Gambar 6). Molekul kitosan memiliki gugus NH₃ bermuatan positif. Semakin tinggi konsentrasi kitosan, semakin besar muatan positifnya, semakin baik kemampuan penyerapannya.



Gambar 5. Grafik Potensial Zeta Nanopartikel

membentuk nanopartikel dengan indeks polidispersitas terbaik

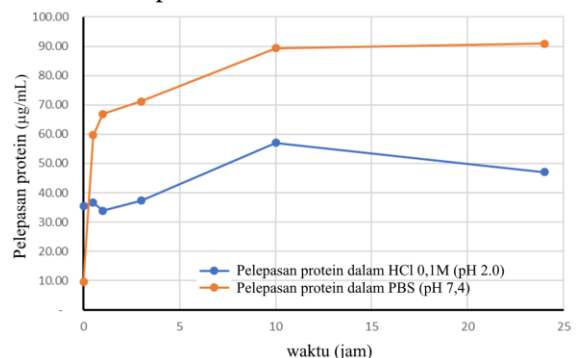
Gambar 6 menunjukkan variasi konsentrasi kitosan 0,15% dan volume STPP 0,75 mL, yang merupakan komposisi konsentrasi tertinggi, menunjukkan efisiensi penyerapan terbaik.



Gambar 6. Efisiensi Penjerapan nanopartikel

Pelepasan Antigen Invitro

Pengujian pelepasan antigen invitro dilakukan untuk menentukan stabilitas nanopartikel HBcAg di saluran pencernaan dengan menguji stabilitasnya dalam pelarut asam dan basa. Pengujian dalam larutan asam mensimulasikan kondisi di lambung sedangkan pengujian dalam larutan basa mensimulasikan kondisi di usus. Hasil pengukuran pelepasan antigen invitro menunjukkan bahwa ada kecenderungan bahwa pelepasan protein dalam kondisi asam lebih rendah dibandingkan dengan protein dalam kondisi basa. Hal ini dapat dijelaskan karena pembentukan nanopartikel kitosan dilakukan dalam kondisi asam dalam pelarut asam asetat.



Gambar 7. Kurva pelepasan antigen secara invitro dalam larutan asam (pH 2,0) dan larutan alkali (pH 7,4)

SIMPULAN

Metode gelasi ionik dapat menghasilkan nanopartikel kitosan yang mengandung protein rekombinan HBcAg (MW ~ 3,8 kDa) dengan ukuran hingga 126,4 nm dari kombinasi 2:1 antara kitosan 0,1% dan STPP 0,1%, sedangkan kombinasi 5:3 menghasilkan keseragaman nanopartikel terbaik dengan indeks polidispersi sebesar 0,319. Stabilitas nanofluida terbaik diperoleh dari kombinasi 2:1 kitosan 0,15% dan STPP 0,1% dengan nilai potensial zeta sebesar 22,2 mV. Efisiensi penangkapan tertinggi sebesar 94,26% diperoleh dalam kombinasi 4:3 antara kitosan 0,1% dan STPP 0,1%. Pelepasan protein dari struktur nanopartikel lebih baik dalam larutan asam (pH 2) daripada dalam larutan basa (pH 7,4).

DAFTAR PUSTAKA

- [1] WHO, Global Hepatitis Report, 2017, Department of HIV and Global Hepatitis Programme of the WHO, 2017.
- [2] J. C. Aguilar, Y. Lobaina, V. Muzio, D. Garcia, dan T. Children, Development of a nasal vaccine for chronic hepatitis B infection that uses the ability of hepatitis B core antigen to stimulate a strong Th1 response against hepatitis B surface antigen, *Immunol. Cell Biol.*, 5 (2014) 539-546.
- [3] S. Mohammad, F. Akbar, M. Al-mahab, M. H. Uddin, dan S. I. Khan, HBsAg, HBcAg, and combined HBsAg/HBcAg-based therapeutic vaccines in treating chronic hepatitis B virus infection, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, 12 (2013) 363-369
- [4] A. Roobrouck, A. Farhoudi, P. Vanlandschoot, dan I. Desombere, Prevention of hepatitis B infections: Vaccinations and its limitations, *Acta Clin. Belg.*, 56 (2001) 209-219
- [5] L. Yang, F. Liu, X. Tong, D. Hoffmann, dan J. Zuo, Treatment of chronic hepatitis B virus infection using small molecule modulators of nucleocapsid assembly: recent advances and perspectives *Institute of Virology, Infect. Dis. (Auckl.)*, 5 (2019) 1-46
- [6] S. Mohammad, F. Akbar, S. Chen, M. Al-mahab, M. Abe, dan Y. Hiasa, Strong and multi-antigen specific immunity by hepatitis B core antigen (HBcAg)-based vaccines in a murine model of chronic hepatitis B: HBcAg is a candidate for a therapeutic vaccine against hepatitis B virus, *Antiviral Res.*, 96 (2012) 59-64.
- [7] J. Li et al., Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and core antigen (HBcAg) combine CpG oligodeoxynucleotides as a novel therapeutic vaccine for chronic hepatitis B infection, *Vaccine (Elsevier)*, 5 (2015) 4247-4254.
- [8] Y. Lin, H. Wu, D. Chen, dan P. Chen, Hepatitis B Virus Nucleocapsid but Not Free Core Antigen Controls, *J. Virol.*, vol. 86 (2012) 9266-9273.
- [9] J. P. Stewart dan S. R. Carding, Mucosal vaccines and technology, *Clin. Exp. Immunol.*, 196 (2019) 205-214.
- [10] E. Soares, S. Jesus, dan O. Borges, Oral hepatitis B vaccine: chitosan or glucan based delivery systems for efficient HBsAg immunization following subcutaneous priming, *Int. J. Pharm.*, 535 (2018) 261-271.
- [11] S. J. Streatfield, Oral hepatitis B vaccine candidates produced and delivered in plant material, *Immunol. Cell Biol.*, 83 (2005) 257-262.
- [12] B. Nanomaterials, Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials, *Int J Adv Res*, 4 (2017) 411-427.
- [13] M. Kaimudin, B. Riset, I. Ambon, J. Kebun, dan C. Ambon, Karakterisasi Kitosan dari Limbah Udang dengan Proses Bleaching dan Deasetilasi yang Berbeda, *Maj. Biam ejournal Kemenperin*, 12 (2016).
- [14] U. Takahiro et al., Microencapsulation of Hepatitis B Core Antigen for Vaccine

Preparation, *Pharm. Res.*, 15 (1988) 170–1712

- [15] M. A. Mohammed, J. T. M. Syeda, K. M. Wasan, dan E. K. Wasan, An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery, *Pharm.*, 9 (2017) 2–26.
- [16] A. Z. Mustopa, Soluble expression and purification of hepatitis B core antigen (HBcAg) subgenotype B3 in *Escherichia coli* using thioredoxin fusion tag Asian Pacific Journal of Tropical Disease, *Asian Pacific J. Trop. Dis.*, 7 (2017) 496–501
- [17] M. Hecht, Recombinant Proteins Can Be Isolated from *E. coli* Cells by Repeated Cycles of Freezing and Thawing, *Bio/Technology*, 12 (1994) 1357-1360.