

Formulasi dan Karakterisasi Nanopartikel Sambungsilang Gom Xantan dan Gom Akasia Untuk Penghantaran Insulin Oral

Formulation and Characterization of Cross-Linked Xanthan Gum-Acacia Gum Nanoparticles For Oral Insulin Delivery

Ade Laura Rachmawati, Silvia Surini*

Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok

ABSTRAK

Nanopartikel insulin telah dikembangkan sebagai alternatif penghantaran insulin oral. Sistem penghantaran obat dengan nanopartikel dapat diperoleh dari polimer sambungsilang gom xantan dan gom akasia dengan natrium trimetafosfat. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan nanopartikel insulin dengan menggunakan gom xantan dan gom akasia tersambungsilang untuk penghantaran oral. Pada penelitian ini nanopartikel insulin diperoleh dengan mencampur koloid gom xantan dan gom akasia dengan perbandingan 1:1 yang kemudian direaksikan dengan natrium trimetafosfat dalam suasana basa. Kemudian insulin dalam larutan HCl dimasukkan ke dalam koloid dan dikeringkan sehingga diperoleh serbuk nanopartikel insulin. Serbuk nanopartikel insulin dikarakterisasi meliputi penentuan data derajat substitusi (DS), efisiensi penjerapan, Dv_{90} , daya mengembang, uji pelepasan obat *in vitro*, dan uji stabilitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nanopartikel insulin yang terbentuk memiliki DS: 0,08 – 0,10 dengan efisiensi penjerapan 26,11% - 48,73%. Selain itu, nanopartikel insulin yang diperoleh memiliki nilai Dv_{90} : 547 nm - 726 nm, dan daya mengembang sebesar 1,1 - 2,9 kali di dalam HCl pH 1,2 dan 2,5 - 3,4 kali di dalam dapar fosfat pH 6,8. Uji pelepasan *in vitro* menunjukkan bahwa dalam 3 jam telah dilepaskan insulin sebanyak 78,42% - 85,09%. Hasil uji stabilitas pada suhu 4 °C menunjukkan bahwa kadar insulin dalam nanopartikel adalah 74,46% - 85,09% pada minggu ke-9. Sebagai kesimpulan, penelitian ini menunjukkan bahwa nanopartikel gom xantan dan gom akasia tersambungsilang berpotensi untuk digunakan sebagai sistem penghantaran insulin oral.

ARTICLE HISTORY

Received: July 2018

Revised: August 2018

Accepted: December 2018

Kata kunci: nanopartikel insulin; sambungsilang; insulin oral; gom xantan; gom akasia

ABSTRACT

The insulin nanoparticles has been developed as an alternative to oral insulin delivery. Nanoparticle drug delivery system could be prepared by a cross-linked polymer, which was composed of xanthan gum and acacia gum, and cross-linked by sodium trimetaphosphate. The aim of the present study was to produce insulin nanoparticles using the cross-linked polymer of xanthan gum and acacia gum for oral delivery. In this study, insulin nanoparticles was prepared by mixing xanthan gum and acacia gum colloid with the ratio 1:1 and using sodium trimetaphosphate as a cross-linking agent in bases condition. Afterwards, insulin solution in HCl was added into the colloid, and then dried to produce the insulin nanoparticles. Insulin nanoparticle powders were characterized in terms of degree of substitution (DS), entrapment efficiency, Dv_{90} , swelling ability, *in vitro* release study, and stability test. The results showed that the substitution degree of the insulin nanoparticles was 0.08 – 0.10 and the entrapment efficiency was 26.11% - 48.73%. Moreover, the insulin nanoparticles had Dv_{90} value 547 nm - 726 nm and swelling index of 1.1 - 2.9 in HCl pH 1.2 and 2.5 - 3.4 in phosphate buffer pH 6.8, respectively. According to the dissolution study, the insulin nanoparticles provided the insulin release of 78.42% - 85.67% within 3 hours. Furthermore, stability testing showed insulin content after 9 weeks incubation at 4°C was 74.46% - 85.09%. Therefore, this work demonstrated that a cross-linked polymer of xanthan gum and acacia gum nanoparticle could be potential for could be potential for oral insulin delivery system.

*Corresponding author

Email : silvia@farmasi.ui.ac.id

Keywords: insulin nanoparticles; crosslinked; oral insulin; xanthan gom; gom acacia

PENDAHULUAN

Dewasa ini pemanfaatan nanopartikel sedang berkembang di berbagai bidang. Nanopartikel adalah partikel yang berukuran 10-1000 nm terdiri dari bahan polimer alami maupun sintetis, dapat digunakan sebagai pembawa obat dengan cara melarutkan, memerangkap, mengenkapsulasi, menjerap atau menempelkan zat aktif (Mohanraj & Chen, 2006). Dalam dunia farmasetika pemanfaatan nanopartikel bertujuan untuk berbagai hal antara lain untuk penghantaran tertarget dan meningkatkan bioavailabilitas obat (Friedman *et al.*, 2013). Dengan pemanfaatan nanopartikel obat dapat dimasukkan kedalam sistem tanpa reaksi kimia dan sistem nanopartikel dapat diterapkan untuk berbagai sasaran pengobatan karena nanopartikel masuk kedalam sistem peredaran darah dan dibawa oleh darah menuju target pengobatan. Salah satu pemanfaatan nanopartikel adalah untuk penghantaran insulin secara oral (Chopra, 2017; Alai *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2012).

Insulin merupakan protein yang digunakan untuk mengontrol kadar gula darah pada penderita diabetes melitus tipe 1 (IDDM/ *Insulin Dependent Diabetes Mellitus*) dan tipe II (NIDDM/*Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus*) yang sudah tidak dapat terkontrol dengan pemberian anti diabetes oral dan diet makanan (Sweetman, 2009). Insulin yang diberikan secara oral merupakan pilihan alternatif yang ideal dibandingkan pemberian sub kutan karena tingkat kenyamanan pasien yang tinggi. Kendala yang muncul pada pemberian insulin secara oral adalah bioavailabilitasnya yang rendah. Insulin merupakan makromolekul protein yang secara normal tidak dapat melintasi sel epitel usus dan terdegradasi pada saluran cerna sebelum diabsorpsi (Woitiski *et al.*, 2012). Terdapat 3 faktor yang menyebabkan bioavailabilitas insulin rendah yaitu faktor enzimatik, fisiologis dan fisikokimia. Insulin akan terdegradasi oleh enzim intrasel *cathepsin*, flora normal usus, dan enzim proteolitik. Faktor fisiologis yaitu sel epitel di saluran cerna terdiri *tight junction* yang rapat dan dilapisi oleh cairan musin dan lapisan glikokaliks yang menghambat insulin untuk dapat terabsorpsi. Faktor fisikokimia adalah ukuran pori mukosa usus yang kecil yaitu 7-15 Å, ini merupakan halangan untuk insulin yang merupakan makromolekul (Alai *et al.*, 2015).

Salah satu strategi untuk meningkatkan bioavailabilitas insulin oral adalah dengan menggunakan nanopartikel. Nanopartikel dapat meningkatkan bioavailabilitas insulin oral karena dengan ukuran partikel yang lebih kecil luas permukaan absorpsi menjadi besar dan mampu menembus jalur paraselular dan masuk ke saluran sistemik (Delie & Blanco, 2005). Pembawa nanopartikel untuk penghantaran insulin oral dapat menggunakan

polimer alami maupun sintetis. Pemilihan pembawa nanopartikel insulin berupa polimer alami lebih disukai, dikarenakan sifatnya yang *biodegradable* (Maitra & Shukla, 2014). Beberapa polimer alami tersebut antara lain gom xantan, gom akasia, natrium alginat, gelatin dan kitosan. Beberapa penelitian mengenai kemampuan polimer alami untuk dijadikan pembawa insulin secara oral sudah dilakukan namun masih terbatas pada pemanfaatan kitosan (Avadi *et al.*, 2011; Daud, 2015; Istiyani, 2008; Mardiyati, 2012 & Reddy *et al.*, 2012). Pada penelitian kali ini akan digunakan polimer alami yaitu gom xantan dan gom akasia.

Polimer yang digunakan sebagai pembawa insulin oral harus mampu mencegah pelepasan dan degradasi insulin sebelum sampai ke lokasi absorpsi (Chopra, 2017; Delie & Blanco, 2005; Renunkuntla, 2013). Polimer dengan sifat tersebut dapat dihasilkan dari modifikasi kimia antara gom xantan dengan gom akasia melalui metode sambung silang (*Cross linking*) dengan natrium trimetaphosfat (STMP) sebagai agen sambungsilang. Reaksi sambung silang akan mengurangi gugus hidroksil dari gom xantan dan gom akasia sehingga polimer yang dihasilkan berkurang kelarutannya didalam air dan memiliki kekuatan gel yang kuat sehingga mampu mempertahankan kadar insulin selama transport sampai ke usus (Maitra & Shukla, 2014). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan nanopartikel insulin oral dari gom xantan-gom akasia tersambungsilang.

METODE

Alat yang digunakan neraca analitik (Sartorius, Jerman), pengaduk magnetik (IKA C-MAC HS 7), pH meter (Eutech 510, Singapura), *Particle Size Analyzer* (Malvern), *Transmission Electron Microscope* (TEM) (JEOL JEM-1400, Jerman), *fourier-transform infrared spectrometer* 8400 S (Shimadzu, Jepang), Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan pompa model LC-6A detektor UV Vis SPD 20 A (Shimadzu, Jepang), Spektrofotometer UV-1800 (Shimadzu, Jepang), *freeze dryer* (Scanvac), desikator, dan alat-alat gelas.

Bahan yang digunakan gom xantan (Jungbunzlauer, Austria), gom akasia (Willy Beneckf, Jerman, Insulin humanized (Wako, Jepang), natrium trimetaphosfat (Xinxiang Huangxing Chemical Co., Ltd.), natrium hidroksida (Brataco, Indonesia), asam klorida (Brataco, Indonesia), kalium hidrogen fosfat (Merck), metil parahidroksibenzoat (Ueno Fine Chemicals Industry., Ltd., Jepang), asetonitril (JT. Baker), asam trifluoroasetat (Merck), dan aqua destilata (Brataco).

Pembuatan Nanopartikel Insulin Sambungsilang Gom Xantan dan Gom Akasia

Pembuatan nanopartikel sambungsilang gom xantan

dan gom akasia menggunakan gom xantan dan gom akasia dengan konsentrasi masing-masing 0,1%, 0,2% dan 0,3% (b/v) didispersikan dalam aquadest dengan sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik 1200 rpm. Buat larutan natrium trimetaphosfat (STMP) dalam aquadest untuk mendapatkan konsentrasi $\pm 112,5$ mg/ml (Tao *et al.*, 2016). Perbandingan natrium trimetaphosfat : konsentrasi gom xantan an gom akasia 1,2:1 (w/w). Larutan natrium trimetaphosfat ditambahkan ke dalam dispersi dengan pengadukan terus menerus menggunakan pengaduk magnetik dengan kecepatan 1200 rpm. Teteskan larutan NaOH 10 N sedikit demi sedikit ke dalam massa untuk menjaga pH selama reaksi pada pH 11 – 12. Reaksi dilanjutkan selama 1 - 4 jam (dihentikan ketika sudah tidak terjadi penurunan pH), kemudian suspensi dinetralkan (pH 6) dengan larutan HCl 7 N (Wati, 2017). Insulin sejumlah 3 mg dilarutkan dalam 5 tetes HCl 0,1 N lalu tambahkan 5 ml aquadest. Larutan insulin ini kemudian dimasukkan kedalam koloid matriks sambungsilang, lalu diaduk menggunakan pengaduk magnetik 1200 rpm selama 15 menit. Koloid dikeringkan menggunakan metode kering beku (*freeze dried*) pada suhu -110 °C dan tekanan 70 mmHg sampai kering. Formula nanopartikel insulin sambungsilang gom xantan dan gom akasia dapat dilihat pada Tabel 1.

Karakterisasi Nanopartikel Insulin Sambungsilang Gom Xantan-Gom Akasia

Ukuran Diameter Partikel

Ukuran diameter partikel diukur menggunakan metode *light scattering* (pemendaran cahaya) dengan menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA) pada suhu 25 °C. Pengukuran ukuran partikel menggunakan serbuk nanopartikel insulin tersambungsilang gom xantan-gom akasia didispersikan dalam dapar fosfat pH 6,8. Kemudian diambil ± 1 ml dan dimasukkan dalam kuvet lalu diukur.

Analisa Gugus Fungsi

Dilakukan untuk mengetahui adanya perubahan gugus fungsi akibat hasil reaksi sambungsilang gom xantan-gom akasia. Sejumlah serbuk digerus bersama kalium bromida (KBr). Setelah homogen letakan dalam wadah sampel. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan

Fourier Transformation Infra Red (FTIR) pada bilangan gelombang 400 sampai 4000 cm^{-1} .

Derajat Substitusi

Derajat substitusi fosfat dari natrium trimetaphosfat sebagai agen sambungsilang ditetapkan dengan metode kolorimetri (Marthur, 2003). Pereaksi yang akan digunakan merupakan pereaksi campuran dari pereaksi A dan pereaksi B dengan perbandingan 1:6. Pereaksi A merupakan larutan asam askorbat 10% dalam aquadest. Pereaksi B merupakan larutan ammonium molibdat tetrahidrat 0,42% dalam H_2SO_4 1N. Derajat substitusi ditentukan dengan menggunakan rumus berikut, di mana P merupakan % fosfor (%P) dari xantan gum yang terfosforilasi. Angka 162 merupakan berat molekul dari satu unit glukosa, angka 3100 merupakan berat molekul fosfor (P) dikalikan 100. Angka 102 merupakan berat molekul fosfat yang tertaut dihitung sebagai gugus – PO_3Na .

$$DS = \frac{162P}{3100 - 102P}$$

Daya Mengembang di Media HCl pH 1,2 dan Dapar Fosfat pH 6,8

Sejumlah serbuk nanopartikel insulin tersambungsilang gom xantan-gom akasia dikempa menjadi tablet (W_1), kemudian dimasukkan kedalam gelas beaker berisi 20 ml medium HCl pH 1,2 suhu 37°C. Tablet ditimbang pada menit ke-15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, dan 480 (W_2). Prosedur yang sama dilakukan dengan medium dapar fosfat pH 6,8. Kemampuan mengembang dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Daya mengembang (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100\%$$

Morfologi Permukaan

Morfologi dapat dilihat dengan menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM). Tahapan pengerjaan TEM adalah dengan preparasi sampel pada suhu ruang menggunakan pewarnaan 1% asam fosfotungstat (pH 6,0). Setelah itu sampel ditetaskan pada *carbon coated cooper grid* sebanyak satu tetes lalu dikeringkan pada suhu ruang, setelah kering dianalisa dengan TEM.

Tabel 1. Formula Nanopartikel Insulin Sambungsilang Gom Xantan dan Gom Akasia

Nama Bahan	Formula 1	Formula 2	Formula 3
Insulin (mg)	3,0	3,0	3,0
Gom xantan (% w/v)	0,1	0,2	0,3
Gom akasia (% w/v)	0,1	0,2	0,3
Natrium trimetaphosfat (mg)	0,24	0,48	0,72
Aquadest (ml)	100	100	100

Penjerapan Zat Aktif

Timbang seksama serbuk nanopartikel insulin tersambungsilang gom xantan-gom akasia, masukkan dalam labu ukur 10 ml. Tambahkan 5 tetes HCl 0,1 N dan cukupkan volumenya sampai 10,0 ml dengan dapar fosfat pH 6,8, lalu dianalisis dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Insulin dianalisa menggunakan 2,0 ml larutan metil parahidroksibenzoat 10 ppm sebagai baku dalam. Kolom C18 (panjang 150 mm x 4,6 mm) digunakan sebagai kolom dan fase gerak digunakan campuran asetonitril dengan 0,1 % larutan trifluoroasetat perbandingan 31:69, kecepatan alir fase gerak 1,5 ml/menit serta *volume inject* 20 µl. Detektor yang digunakan merupakan detektor ultraviolet pada panjang gelombang 280 nm (Surini *et al.*, 2003). Kadar insulin dihitung dengan menggunakan persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi.

Uji Pelepasan In Vitro di Media Dapar Fosfat pH 6,8

Sejumlah serbuk nanopartikel insulin tersambungsilang gom xantan-gom akasia diinkubasi dalam 20 ml dapar fosfat pH 6,8 dengan kecepatan pengadukan 50 rpm selama 180 menit pada suhu $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Sampel 1 ml diambil setiap interval waktu yang ditentukan dan diganti dengan medium *fresh* dalam jumlah yang sama. 1 ml sampel kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 5,0 ml ditambahkan 2,0 ml larutan metil parahidroksibenzoat 10 ppm sebagai baku dalam Sampel kemudian dianalisa menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

Uji Stabilitas

Uji stabilitas dilakukan pada 3 variasi suhu penyimpanan yaitu 4 °C, 25 °C dan 40 °C. Pengujian dilakukan dengan rentang waktu 0, 1, 2, 3, 6, 9 dan 12 minggu dengan parameter pengujian pengamatan fisik dan kadar insulin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Nanopartikel Insulin Sambungsilang Gom Xantan-Gom Akasia

Penggunaan gom xantan dan gom akasia didasarkan pada sifatnya yang *biodegradable* karena merupakan polimer alami (Guo *et al.*, 2014), aman dan sudah luas digunakan untuk bahan tambahan rute oral (Ogaji & Audu, 2012). Gom xantan merupakan heteropolisakarida yang memiliki berat molekul tinggi yang dihasilkan dari fermentasi murni kultur aerobik dari karbohidrat dengan bakteri *Xanthomonas campestris* (Guo *et al.*, 2014; Rowe & Quinn, 2009). Gom xantan memiliki tingkat pengembangan (*sweeling*) dan kekuatan gel yang baik, bersifat non toksik dan tidak mengiritasi (Bejenariu *et al.*, 2009). Larutan gom xantan stabil pada pH luas yaitu pada pH 3-12 dan stabil dengan adanya enzim, garam, asam dan basa (Rowe & Quinn, 2009). Gom xantan merupakan polimer yang memiliki efek hipoglikemik sehingga bekerja sinergis dengan insulin (Reddy *et al.*,

2012). Gom akasia (Gom arab) merupakan kompleks polisakarida yang bersifat hidrofilik yang berasal dari batang dan ranting tanaman Akasia senegal (Desplanques *et al.*, 2012; Rowe & Quinn, 2009). Koloid gum akasia memiliki viskositas dan daya mengembang yang lebih kecil dibanding gom xantan.

Kemampuan gom xantan dan gom akasia sebagai pembawa nanopartikel insulin oral dapat ditingkatkan melalui modifikasi secara kimia yaitu reaksi sambungsilang. Reaksi sambungsilang adalah proses penstabilan pada polimer secara kimiawi karena adanya perpanjangan multidimensi rantai polimer yang membentuk struktur jaringan (Sarika *et al.*, 2014 dan Shah *et al.*, 2016). Pada suasana basa gom xantan dan gom akasia akan terionisasi sehingga dapat bereaksi dengan natrium tripolifosfat membentuk campuran mono dan fosfat diester. Campuran ini akan bereaksi dengan gugus hidroksil dari gom xantan dan gom akasia sehingga terjadi reaksi sambung silang. Selama terjadi reaksi sambung silang akan terjadi penurunan pH 0,2-0,5. Penurunan pH ini dikarenakan adanya hasil samping reaksi yaitu berupa fosfat inorganik yang bersifat asam. Untuk itu pH perlu dijaga dengan penambahan beberapa tetes NaOH 10 N (Bejenariu *et al.*, 2009). Reaksi sambungsilang telah selesai jika sudah tidak terjadi penurunan pH. Setelah tidak terjadi penurunan pH maka koloid dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer*. Pemanfaatan gom xantan dalam pembuatan matriks nanopartikel untuk penghantaran insulin oral dilakukan oleh penelitian sebelumnya (Reddy, *et al.*, 2012) dengan konsentrasi 0,05 – 0,20 % dengan cara pembuatan kompleks polielektrolit antara kitosan (polianion) dengan natrium tripolifosfat (STP) sebagai polikation. Penelitian lain yang dilakukan Coelho *et al* (2011) menggunakan konsentrasi gom akasia : kitosan dengan perbandingan 0,6 – 3. Pada penelitian ini gom xantan dan gom akasia hanya sebagai bahan tambahan. Bahan pembawa utama insulin adalah kitosan. Pada penelitian kali ini tidak menggunakan kitosan, polimer utama yang digunakan adalah gom xantan dan gom akasia.

Insulin dijerap didalam matriks pada tahap akhir, yaitu setelah reaksi sambungsilang selesai dan pH matriks kembali diturunkan sampai pH 6. Penambahan insulin pada tahap akhir untuk mencegah terjadinya degradasi insulin. Insulin tidak ditambahkan saat reaksi sambung silang dikarenakan reaksi sambung silang membutuhkan kondisi basa yaitu 10-11 sedangkan insulin akan rusak dalam suasana basa. Penambahan beberapa tetes HCl 0,1 N adalah untuk melarutkan insulin, karena insulin larut dalam asam. Penambahan insulin kedalam matriks dalam bentuk larutan bukan dalam bentuk serbuk insulin adalah untuk meningkatkan homogenitas insulin dalam matriks (Sweetman, 2009). Pengadukan insulin lebih dari 30 menit dapat membuat insulin terdegradasi (Reddy *et al.*, 2012).

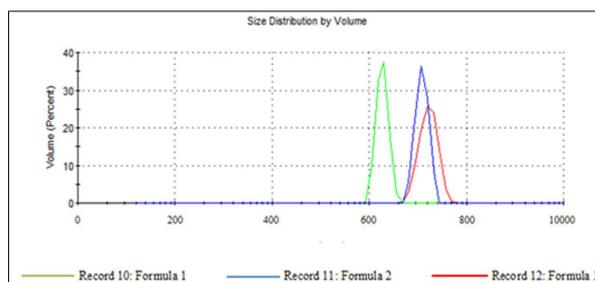
Rendemen yang didapat dari proses pengeringan beragam yaitu sebesar 84,4% - 86,5%. Metode pengeringan lain yang dapat digunakan adalah dengan *spray dryer*, rata-rata rendemen hasil pengeringan menggunakan metode *spray dryer* adalah 85 – 89% (Reddy *et al.*, 2012). Serbuk hasil pengeringan kemudian diletakkan pada wadah plastik dan disimpan pada suhu 4 °C. Pemilihan wadah plastik dibanding wadah kaca pada penyimpanan insulin dikarenakan insulin akan menempel pada permukaan wadah yang terbuat dari kaca (Renukuntla *et al.*, 2013). Hal ini dapat mengurangi kadar insulin didalam matriks sambungsilang.

Metode pembuatan nanopartikel pada penelitian kali ini menggunakan metode *top down* yaitu pengecilan ukuran partikel menggunakan pengadukan (Patravale *et al.*, 2004). Menurut Agnihotri, Malikarjuna & Aminabhavi, T.M (2004) dan Tiyaboonchai (2003), metode yang dapat digunakan untuk untuk menghasilkan mikro dan nanopartikel dalam penghantaran insulin oral adalah metode ikatan silang emulsi (*emulsion-crosslinking*), presipitasi (*presipitation*), pengeringan semprot (*spray drying*), metode penggabungan droplet (*emulsion droplet coalescence method*), gelasi ionik (*ionic gelation*), *reverse micellar method*, penguapan pelarut dan kompleks polielektrolit (*polyelectrolite complex*). Penelitian sebelumnya dilakukan pembuatan dengan metode gelasi ionik dan kompleks polielektrolit dengan natrium tripolifosfat (STP) sebagai polikation (Reddy *et al.*, 2012; Mardiyati *et al.*, 2012; Coelho *et al.*, 2011).

Karakterisasi Nanopartikel Insulin Sambungsilang Gom Xantan-Gom Akasia.

Ukuran Diameter Partikel

Distribusi ukuran partikel heterogen dengan indeks polidispersitas 0,437 – 0,575. Dv_{90} untuk Formula 1-3 berturut-turut sebesar 546 nm, 704 nm dan 726 nm. Metode pembuatan nanopartikel secara *top down* menggunakan pengadukan energi tinggi menghasilkan ukuran partikel yang lebih besar dibandingkan dengan pembuatan nanopartikel dengan metode gelasi ionik yang merupakan metode secara *bottom up*, yaitu pembentukan nanostruktur molekul demi molekul dalam pelarut organik dan diendapkan dengan penambahan antisolvent nya (Patravale *et al.*, 2004). Pada penelitian sebelumnya menggunakan metode gelasi ionik dengan menggunakan polimer yang sama yaitu gom xantan dan gom akasia namun metode dihasilkan partikel dengan ukuran 177 – 191 nm (Avadi *et al.*, 2010); 81,2 nm (Reddy *et al.*, 2012). Metode lain seperti emulsi ganda (A/M/A) menghasilkan ukuran partikel yang lebih besar yaitu 400-1300 nm (Mutalijeve *et al.*, 2017). Distribusi ukuran partikel dapat dilihat pada Gambar 1.

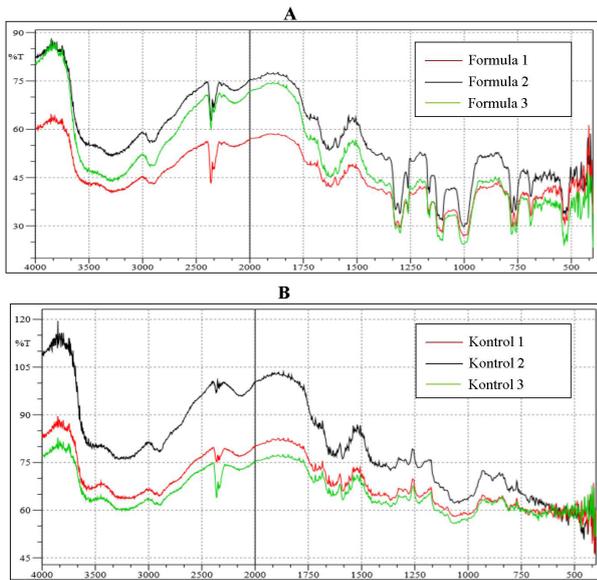


Gambar 1. Distribusi Diameter Partikel Formula 1, 2 dan 3 Berdasarkan Volume

Ukuran partikel berperan penting pada penghantaran insulin secara oral, insulin yang terjepit pada matriks dengan ukuran nanometer mampu membantu absorpsinya di usus halus. Ukuran partikel yang paling baik untuk absorpsi di usus adalah 40-120 nm dengan jalur transeluler maupun parseluler. Partikel dengan ukuran dibawah 2000 nm masih memungkinkan untuk dapat bermigrasi dalam *Peyer's Patches* (PPs). PPs adalah lapisan tunggal epitel yang tersebar diseluruh usus terutama di ileum. Partikel ukuran nano juga dapat terabsorpsi dengan sistem makrofag pada sel M (Bhardwaj *et al.*, 2006).

Analisa Gugus Fungsi

Analisa gugus fungsi ini bertujuan untuk memastikan adanya gugus fungsi baru yaitu hasil reaksi sambungsilang. Reaksi sambungsilang yang terjadi melibatkan adanya substitusi fosfat pada gugus hidroksil gom xantan dan/atau gom akasia. Pada serbuk hasil sambungsilang muncul pita serapan pada panjang gelombang gelombang 1000, 1124, dan 1333 cm^{-1} yang menunjukkan gugus fungsi P-O. (J.Liu *et al.*, 2014 dan Tao *et al.*, 2016), bilangan gelombang 2400 – 3500 yang merupakan bilangan gelombang –OH dan bilangan gelombang 2200 yang merupakan bilangan C-O karboksilat dari gom xantan dan/atau gom akasia yang tidak tersubstitusi Pada serbuk kontrol yang merupakan campuran fisik antara gom xantan dan gom akasia hanya muncul bilangan 2400 – 3500 cm^{-1} yang merupakan pita serapan –OH karboksilat dan 2200 yang merupakan bilangan C-O karboksilat dari gom xantan dan gom akasia. FTIR tidak mampu menjelaskan ada berapa banyak gugus OH dari gom xantan dan/atau gom akasia yang tersubstitusi fosfat tetapi hanya dapat digunakan untuk mengidentifikasi secara kualitatif adanya suatu gugus fungsi tertentu dari suatu senyawa. Jumlah gugus hidroksi dari gom xantan dan /atau gom akasia yang tersubstitusi oleh gugus fosfat ditentukan dengan menghitung derajat substitusi (DS). Spektrum hasil pemeriksaan FTIR dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Pemeriksaan Ftir Serbuk Sambungsilang (A) dan Kontrol (B)

Derajat Substitusi

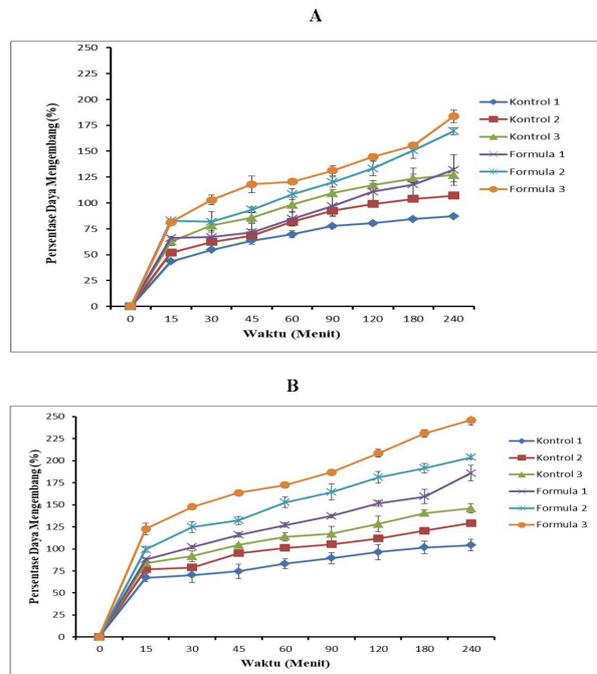
Derajat substitusi ditentukan untuk mengetahui berapa banyak gugus hidroksi (-OH) dari gom xantan dan gom akasia yang tersubstitusi oleh gugus fosfat dari natrium trimetaphosfat. Hasil dinyatakan dalam *Degree of Substitution* (DS) yang didapat dari perhitungan. Untuk menghitung DS diperlukan data %P yaitu jumlah fosfat yang terukur. Perlu dilakukan pengukuran %P didalam gom xantan dan gom akasia, karena dalam proses produksi gom xantan melibatkan fosfat, belerang dan nitrogen. Dikhawatirkan masih terdapat sisa fosfat bebas (Garcia-Ochoa et al., 2000). Pada pengukuran kali ini didapat %P pada gom xantan sebesar 0,07%. Pada gom akasia tidak terdapat %P. Oleh karena itu %P matriks sambungsilang yang didapat dari pengukuran perlu dikurangi oleh %P dari gom xantan.

Derajat substitusi fosfat dalam formula 1, 2 dan 3 berturut-turut $0,08 \pm 0,01$; $0,09 \pm 0,01$ dan $0,10 \pm 0,01$. Nilai ini menunjukkan pada matriks sambungsilang 1 terdapat 8 gugus fosfat tersubstitusi dalam setiap 100 unit anhidroglukosa gom xantan dan/atau gom akasia. Pada matriks sambungsilang 2 terdapat 9 gugus fosfat tersubstitusi dalam setiap 100 unit anhidroglukosa gom xantan dan/atau gom akasia. Pada matriks sambungsilang 3 terdapat 10 gugus fosfat tersubstitusi dalam setiap 100 unit anhidroglukosa gom xantan. Substitusi terjadi pada gugus hidroksil gom xantan dan/atau gom akasia. Derajat substitusi meningkat dengan meningkatnya konsentrasi gom xantan dan gom akasia, karena dengan meningkatnya konsentrasi gom xantan dan gom akasia maka jumlah gugus -OH yang bisa disubstitusi oleh fosfat dari sodium trimetaphosfat semakin banyak. Derajat substitusi ini mempengaruhi karakteristik dari matriks sambungsilang seperti meningkatkan daya mengembang.

Daya Mengembang

Daya mengembang formula 1,2 dan 3 pada media HCl pH 1,2 maupun media dapar fosfat pH 6,8 lebih besar dibanding dengan serbuk hasil gabungan fisik gom akasia xantan-gom akasia (kontrol). Peningkatan daya mengembang matriks sambungsilang berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi gom xantan dan gom akasia. Semakin tinggi konsentrasi gom xantan dan gom akasia maka daya mengembang semakin tinggi. kontrol maupun matriks sambungsilang mampu mengembang selama 4 jam, namun pada kontrol sedikit mengalami erosi pada proses pengembangannya. Reaksi sambung silang membentuk matriks dengan struktur yang kuat sehingga tidak terjadi erosi saat pengembangannya.

Pada media HCl pH 1,2 matriks sambungsilang dengan penggunaan konsentrasi gom xantan dan gom akasia masing-masing 0,3% (formula 3) memberikan nilai daya mengembang yang paling tinggi yaitu sebesar $183,59 \pm 6,05\%$ atau 2,9 x bobot awal. Diikuti dengan formula 2 sebesar $169,32 \pm 3,27\%$ dan formula 1 sebesar $132,01 \pm 14,78\%$. Perbedaan kemampuan mengembang ini disebabkan perbedaan konsentrasi penggunaan gom xantan dan gom akasia. Konsentrasi gom xantan dan gom akasia yang lebih tinggi memiliki kemampuan yang lebih baik karena memiliki gugus hidroksil (-OH) dan gugus karboksilat (-COOH) yang lebih banyak sehingga dapat mengikat air lebih banyak melalui ikatan hidrogen. Pada media dapar fosfat pH 6,8 daya mengembang formula 3 paling tinggi yaitu sebesar $243,83 \pm 5,61\%$

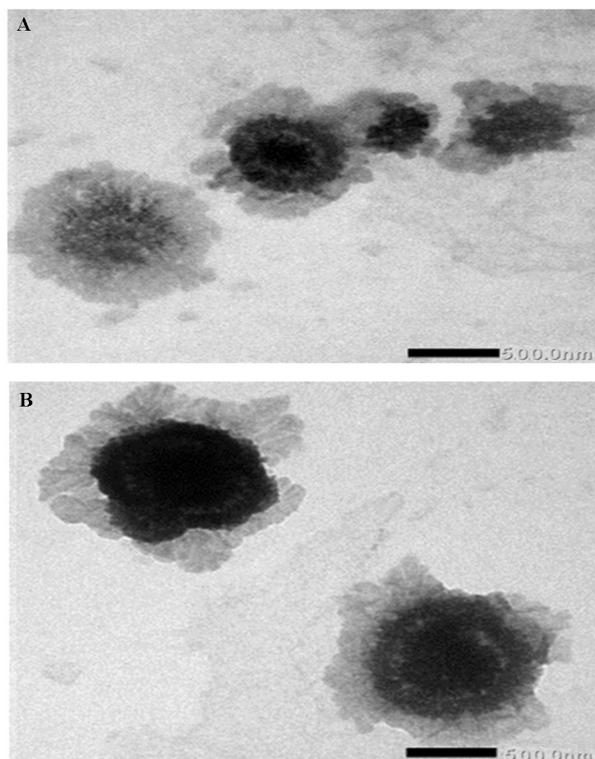


Gambar 3. Hasil Daya Mengembang Sambungsilang Gom Xantan dan Gom Akasia di Media HCl pH 1,2 (A) dan Dapar Fosfat pH 6,8 (B) selama 240 menit.

atau 3,4 x bobot awal. Diikuti dengan formula 2 sebesar $202,18 \pm 1,67\%$ dan formula 1 sebesar $181,73 \pm 8,65\%$. Daya mengembang formula 3 pada media dapar fosfat pH 6,8 lebih besar dibanding pada media HCl pH 1,2. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan pH mampu mempengaruhi daya mengembang matriks sambungsilang. Dengan daya mengembang yang lebih kecil pada pH asam menunjukkan matriks sambungsilang mampu menahan obat pada media asam. Hasil daya mengembang dapat dilihat pada Gambar 3.

Morfologi Permukaan

Hasil pengamatan dengan *Transmission Electron Microscope* (TEM) nanopartikel formula 3 menunjukkan vesikel nanopartikel berbentuk bulat yang tidak beraturan. Mikrograf hasil TEM dapat dilihat pada Gambar 4. Bagian polar pada vesikel ditunjukkan dengan warna hitam sedangkan bagian yang *transparent* atau tidak berwarna menunjukkan adanya suatu senyawa yang bersifat non polar. Metode pembuatan berpengaruh pada bentuk vesikel, pada beberapa penelitian sebelumnya bentuk partikel yang dihasilkan spheris dan seragam, namun pada penelitian kali ini bentuk vesikel yang dihasilkan bulat tidak beraturan. Hal ini perlu dilakukan pengembangan pada penelitian selanjutnya untuk mencari metode pembuatan yang lain agar menghasilkan bentuk vesikel yang lebih baik.



Gambar 4. Morfologi Permukaan Formula 3 menggunakan TEM Perbesaran 40.000 X (A) dan 80.000 X (B)

Penjerapan Insulin

Kadar penjerapan insulin dalam nanopartikel sambungsilang gom xantan-gom akasia ditentukan menggunakan Kromatografi Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor UV-Vis. Metode KCKT dipilih karena memiliki tingkat selektifitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan pengukuran menggunakan spektrofotometer. Sebelum dilakukan pengukuran kadar menggunakan KCKT dilakukan *skrining* insulin dalam larutan dapar fosfat pH 6,8 menggunakan spektrofotometer. Tujuan dari *skrining* ini adalah untuk analisa kualitatif dan menentukan panjang gelombang maksimum insulin untuk digunakan pada pengukuran menggunakan KCKT. Dari hasil *skrining* didapat panjang gelombang maksimum insulin dalam dapar fosfat adalah 280 nm. Panjang gelombang maksimum suatu senyawa dapat bergeser tergantung pada pelarut yang digunakan. Panjang gelombang insulin pada penelitian Reddy *et al* (2012) sebesar 271 nm dengan pelarut HCl 0,1 N, Mutalijeva *et al* (2017) sebesar 600 nm dengan pelarut minyak biji kedelai dan dapar fosfat pH 6,8 dan Surini *et al* (2003) sebesar 280 nm dengan pelarut dapar fosfat pH 7,2. Penetapan kadar insulin menggunakan baku dalam yaitu metilparahidroksibenzoat (metil paraben) (Surini *et al.*, 2003). Penambahan baku dalam ini untuk mengurangi tingkat kesalahan analisa.

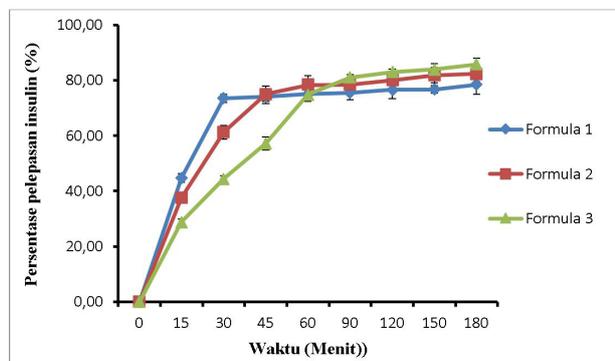
Kromatogram hasil KCKT menghasilkan 2 puncak yaitu puncak metil paraben dan puncak insulin. Metil paraben keluar terlebih dahulu pada menit ke 7,692 dan insulin pada menit ke 8,683 dengan *tailing factor* 1,12 untuk insulin dan 1,011 untuk metil paraben. Resolusi atau keterpisahan antara dua puncak 2,198. Metode analisa ini sudah memenuhi persyaratan yaitu *tailing factor* $\leq 1,5$ dan $R \geq 2,0$ (Shabir, 2003).

Kadar dihitung menggunakan persamaan regresi yang didapat. Persamaan regresi didapat dengan membuat larutan insulin berbagai konsentrasi. Kadar insulin dalam formula 1-3 berurutF-turut sebesar $26,11 \pm 0,49\%$; $34,30 \pm 0,50\%$ dan $48,73 \pm 0,49\%$. Adanya peningkatan kadar insulin yang terjerap menunjukkan adanya efek perlindungan dari sambungsilang gom xantan dan gom akasia. Kadar penjerapan berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi gom xantan dan gom akasia, ini artinya sambungsilang gom xantan dan gom akasia mampu melindungi insulin selama proses pembuatan (pengadukan, pembekuan dan pengeringan) maupun karena lingkungan.

Pelepasan Insulin Dimedium Dapar Fosfat pH 6,8

Uji pelepasan insulin dilakukan pada medium dapar fosfat pH 6,8 selama 180 menit. Pada penelitian kali ini uji pelepasan insulin tidak dilakukan terlebih dahulu pada medium HCl pH 1,2 dikarenakan obat di desain bukan untuk pelepasan enterik. Untuk mengetahui

kemampuan polimer melindungi insulin pada pH 1,2 akan dilakukan pengukuran parameter farmakodinamik dan farmakokinetik melalui uji *in vivo* pada penelitian selanjutnya, sehingga uji *in vitro* tidak dilakukan secara lengkap. Uji pelepasan dilakukan untuk melihat kemampuan dan jumlah insulin yang dapat dilepaskan dari pembawanya. Pelepasan insulin pada formula 1-3 berturut-turut sebesar $78,42 \pm 0,40\%$; $82,24 \pm 0,76\%$ dan $85,67 \pm 2,24\%$ selama 180 menit. Profil pelepasan insulin pada media dapar fosfat dapat dilihat pada Gambar 5. Pada menit ke 15 formula 1 melepaskan insulin lebih tinggi dibanding formula 2 dan 3. Pada formula 3 di menit ke 45 insulin yang terlepas lebih rendah dibanding formula 1 dan 2 dikarenakan konsentrasi gom xantan dan gom akasia yang tersambungsilang lebih tinggi sehingga mampu menahan pelepasan zat aktif. Kemampuan sambungsilang gom xantan dan gom akasia menahan pelepasan insulin berkaitan dengan efek insulin yang diharapkan, dengan pelepasan insulin yang bertahap dan tidak cepat terlepas dengan konsentrasi tinggi di menit-menit awal akan mengurangi risiko terjadinya hipoglikemik pada pasien yang menggunakan insulin oral. Hal inilah yang menjadi salah satu pertimbangan dikembangkannya penghantaran insulin secara oral yaitu untuk mengurangi risiko hipoglikemik pada pemberian insulin secara sub kutan (Calceti *et al.*, 2004 dan Sood *et al.*, 2001). Profil pelepasan insulin pada medium dapar fosfat pH 6,8 dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Profil Pelepasan Insulin di Dapar Fosfat pH 6,8 dari Formula 1, 2 dan 3

Stabilitas

Stabilitas kimia insulin dipengaruhi oleh adanya suhu, pH dan air. Suhu dapat menurunkan kadar insulin karena insulin merupakan protein yang akan terdenaturasi oleh adanya suhu tinggi. Insulin mudah terdegradasi pada suasana asam dan basa. Insulin akan lebih stabil pada keadaan kering dibandingkan dalam larutan, karena dalam larutan akan terjadi ikatan hidrogen yang akan menyebabkan pembentukan dimer atau oligodimer pada insulin. Dimer atau oligodimer akan membuat insulin semakin susah larut dan mengurangi absorpsinya karena ukuran molekul yang semakin besar (Date *et al.*, 2016). Uji stabilitas dilakukan terhadap serbuk dalam wadah plastik ditempatkan pada lemari es (suhu 4 °C), di ruangan lab (25 °C) dan di dalam oven (40 °C). Kadar insulin formula 3 pada masa penyimpanan 9 minggu di suhu 4 °C paling tinggi dibandingkan formula 1 dan 2. Pada penyimpanan 40 °C kadar insulin baik di formula 1, 2 maupun 3 turun drastis, di minggu pertama kadar insulin pada sudah mencapai dibawah 40% dan pada penyimpanan minggu ke 9 sudah dibawah 10%. Hal ini dikarenakan insulin merupakan protein yang akan rusak pada suhu tinggi (Sweetman, 2009). penelitian kali ini menunjukkan suhu penyimpanan insulin yang baik adalah pada suhu 4 °C Hasil pengukuran stabilitas kadar insulin dapat dilihat pada Tabel 2.

KESIMPULAN

Gom akasia dan gom xantan yang dimodifikasi secara sambungsilang dapat menjadi bahan pembawa nanopartikel untuk penghantaran insulin oral. Formula terbaik adalah formula 3 dengan penggunaan gom xantan dan gom akasia masing-masing 0,3% dengan Dv 90 sebesar 726 nm, dan persentase daya mengembang, kadar penyerapan, disolusi di medium fosfat serta kadar pada penyimpanan selama 9 minggu tertinggi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih kami haturkan kepada Pimpinan beserta jajarannya serta pada dosen di Universitas Indonesia yang telah memberikan segala arahan, dukungan dan bantuan selama proses penelitian ini.

Tabel 2. Kadar Insulin Formula 1,2 dan 3 pada Penyimpanan Suhu 4 °C, 25 °C dan 40 °C selama 9 minggu

Suhu Penyimpanan	Formula 1	Formula 2	Formula 3
4 °C	$74,28\% \pm 1,28\%$	$79,47\% \pm 0,99\%$	$85,09\% \pm 2,58\%$
25 °C	$69,11\% \pm 1,60\%$	$74,46\% \pm 2,14\%$	$82,59\% \pm 1,11\%$
40 °C	$4,84\% \pm 0,80\%$	$5,89\% \pm 0,43\%$	$6,83\% \pm 1,42\%$

DAFTAR ACUAN

- Agnihotri SA, Malakarjuna NN, & Aminabhavi TM. (2004). Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Control Release*, 100, 5-28.
- Alai MS, Lin WJ, & Pingale SS. (2015). Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23, 351-358.
- Avadi MR, Sadeghi AMM, Dounighi NM, Dinarvand R, Atyabi F, & Tehrani MR. (2011). Ex vivo evaluation of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum. *ISRN Pharmaceutics*.
- Bejenariu A, Popa M, Dulong V, Picton L, & Le Cerf D. (2009). Trisodium trimetaphosphate crosslinked xanthan networks: Synthesis, swelling, loading and releasing behaviour. *Polymer Bulletin*, 62(4), 525-538.
- Bhardwaj V, Hariharan S, Bala L, Lamprecht A, Kumar N, Pachagnula R Ravi, & Kumar MNV. (2006). Pharmaceutical aspect of polymeric nanoparticles for oral drug delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 1(3), 234-258.
- Calceti P, Salmaso S, Walker G, & Bernkop-Schnurch A. (2004). Development and in vitro evaluation of an oral insulin-PEG delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 22, 315-323.
- Chopra Sunandini. (2017). Development of nanoparticles for oral delivery of insulin. Massachusetts Institute of Technology.
- Coelho S, Flores SM, Herrera JL, Coelho MAN, Pereira AC, & Rocha S. (2011). Nanostructure of polysaccharide complexes. *Journal of colloid and interface science*. 363(2), 450-5.
- Date AA, Hanes J, Ensign LM. (2016). Nanoparticles for oral delivery: design, evaluation and state-of the art. *Journal Control Release*, 240, 505-526.
- Daud Nur Saadah. (2015). Formulasi dan karakterisasi nanopartikel insulin menggunakan polimer kitosan bobot molekul rendah dan pektin dengan metode gelasi ionik. *Magister Ilmu Farmasi Universitas Gadjah Mada Jogja*.
- Delie F, & Blanco-Prieto MJ. (2005). Polymeric particulate to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules*, 65-80.
- Desplanques S, Renou F, Grisel M, & Malhiac C. (2012). Impact of chemical composition of xanthan and acacia gums on the emulsification and stability of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 401-410.
- Friedman AD, Claypool SE, & Liu R. (2013). The smart targeting of nanoparticles. *National Institutes of Health*, 19(35), 6315-6329.
- García Ochoa F, Santos VE, Casas JA, & Gómez E. (2000). Xanthan gum: Production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18(7), 549-579.
- Guo J, Ge L, Li X, Mu C, & Li D. (2014). Periodate oxidation of xanthan gum and its crosslinking effects on gelatin-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 39, 243-250.
- Istiyani Khoirul. (2008). Mikroenkapsulasi insulin untuk sediaan oral menggunakan metode emulsifikasi dengan penyalut natrium alginat dan kitosan. *Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam program magister farmasi depok*. Universitas Indonesia.
- Liu J, Wang B, Lin L, Zhang J, Liu W, Xie J, & Ding Y. (2014). Functional, physicochemical properties and structure of cross-linked oxidized maize starch. *Food Hydrocolloids*, 36, 45-52.
- Maitra J & Shukla VK. (2014). Cross-linking in hydrogels- A review, *American Journal of Polymer* doi: 10.5923/j.ajps.20140402.01.
- Mardiyati E, Mutaqqien SE, & Setyawati DR. (2012). Preparasi dan aplikasi nanopartikel kitosan sebagai sistem penghantaran insulin secara oral. *Pusat teknologi farmasi dan medika BPPT*.
- Marthur A. (2003). Studies on Phosphorylation of Starch in Potato Tubers (*Solanum tuberosum* L.). Patala: Dissertation. *Departement of Biotechnology and Environmental sciences thapar Institute of Engineering and Technology Patiala*.
- Mohanraj VJ & Chen Y. (2006). Nanoparticles – A review. *Trop. J. Of pharmaceuticals*, 561-573.
- Mutalijeveva B, Grigoriev D, Madybekova G, Sharipova A, Aidarova S, Saparbekova A & Miller R. (2017). Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method. *Colloids and Surface A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 521, 147-152.
- Ogaji IJ, Nep EI, & Audu-Peter JD. (2012). Advances in Natural Polymers as Pharmaceutical Excipients. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 3(1), 1-16.

- Patravale VB, Date AA, Kulkarni RM. (2004). Nanosuspensions: A promising drug delivery strategy. *J Pharm Pharmacol*, 567, 827-840.
- Reddy MM, V Shanmugam, & Kaza R. (2012). Design and characterization of insulin nanoparticles for oral delivery. *International Journal of Innovative Pharmaceutical Research*, 3(3), 238-243.
- Renunkuntla J, Vadlapudi AD, Patel A, Boddu SHS, & Mitra AK. (2013). Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *International Journal of Pharmaceutics* 447, 75-93.
- Rowe RC, Sheskey PJ, & Quinn ME. (2009). *Hand Book Of Pharmaceutical Excipient* (6th ed.). London: Pharmaceutical Press.
- Sarika PR, Cinthya K, Jayakrishnan A, Anilkumar PR, & James NR. (2014). Modified gum arabic cross-linked gelatin scaffold for biomedical applications. *Materials Science and Engineering*.
- Shabir GA. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceuticals analysis. *Journal of Chromatography A*, 987, 57-66.
- Shah N, K Rajubhai, & mehta T. (2016). Crosslinking of starch and its effect on viscosity behaviour. *Chemical Engineering*, 32(2), 265-270.
- Sood A, Miglani S, & Moorthy D. (2001). Breakage of insulin syringe needle in subcutaneous tissue. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 14(1), 101-102.
- Surini S, Akiyama H, Morishita M, Nagai T, & Takayama K. (2003). Release phenomena of insulin from an implantable device composed of a polyion complex of chitosan and sodium hyaluronate. *Journal of controlled Release*, 90, 291-301.
- Sweetman SC. (2009). Martindale : The complete drug Reference. Edisi 36. London : *Pharmaceutical press*, 443-453, 1548-1550.
- Tao Y, Zhang R, Xu W, Bai Z, Zhou Y, Zhao S, Xu Y, Yu D. (2016). Rheological behavior and microstructure of release-controlled hydrogels based on xanthan gum crosslinked with sodium trimetaphosphate. *Food Hydrocolloids*, 52, 923-933.
- Tiyabonchai W. (2003). Chitosan nanoparticles; A promising system for drug delivery. *Nares. Uni Journals*, 11(3), 51-66.
- Wati DR. (2017). Preparasi dan karakterisasi eksipien sambung silang dari koproses xantan gum-gum akasia sebagai matriks pada sediaan tablet lepas lambat. *Fakultas Farmasi program sarjana farmasi depok. Universitas Indonesia*.
- Woitiski CB, Carvalho RA, Ribeiro AJ, Neufeld RJ, & Veiga F. (2012). Strategies toward the improved oral delivery of insulin nanoparticles via gastrointestinal uptake and translocation. *Biodrugs*, 22, 223-237.