

**Liofilisasi Hemolisat *Packed Red Cell* Limbah Darah
Palang Merah Indonesia dengan Penambahan Lioprotektan
sebagai Alternatif Standar Hemoglobin**
*Lyophilized Hemolysate Packed Red Cel with Additional Lyoprotectant as an
Alternative Hemoglobin Standard*

**Bambang Supriyanta^{1,2}, Ulyya Rahmawati¹, Martha Atik Martsiningsih¹,
Rita Rena Pudyastuti¹**

¹Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Politeknik Kesehatan Kemenkes Yogyakarta

²Pusat Unggulan Institusi Inovasi Teknologi Terapan Bidang Kesehatan Masyarakat, Politeknik
Kesehatan Kemenkes Yogyakarta

Jalan Tata Bumi 3, Banyuraden, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta

E-mail Korespondensi: ritapudyastuti1968@gmail.com

ABSTRACT

Lyophilization of PRC waste added with 20% sucrose as lyoprotectant. This study aimed to create an alternative Hb standard, replacing the manufacturer's Hb standard. This study used an experimental with *pre and posttest without control group design*. PMI blood waste PRC was processed into hemolysate, added with lyoprotectant, lyophilized, checked Hb levels using the Cyanmethemoglobin method as a group *pre test*, stored at 4°C for six months, checked Hb levels with the Cyanmethemoglobin method as a group *post test*. Homogeneity Test and Stability Test were carried out according to ISO 13528:2015. The average Hb level of PRC lyophilisate before storage (X_r)=15.06 g/dl, obtained $S_s \leq 0.3\sigma_{pt}$, so that it was declared homogeneous according to the homogeneous acceptability value according to ISO 13528: 2015. After being stored for six months at 4°C, the average level of Hb lyophilisate PRC (Y_r) =14,68 g/dl, obtained $|X_r - Y_r| \leq 0.3\sigma_{pt}$ so that it was declared stable according to the stable acceptability value according to ISO 13528: 2015. Hb levels of PRC lyophilisate were stated to be homogeneous and stable for six months. Hb standard from PRC lyophilisate can be used as an alternative to commercial Hb standard.

Keywords: Hemoglobin, homogeneous, lyophilized, PRC, stability

ABSTRAK

Pemeriksaan kadar hemoglobin (Hb) di Pusat Kesehatan Masyarakat (Puskesmas) masih menggunakan metode Sianmethemoglobin. Pemeriksaan kadar Hb dengan metode Sianhemoglobin memerlukan standar Hb yang sekarang sudah tidak diproduksi lagi. Limbah PRC selama ini hanya dibuang, tetapi dengan proses pengawetan dengan cara penambahan lioprotektan dan liofilisasi dapat digunakan untuk standar Hb. Liofilisasi limbah PRC yang ditambah lioprotektan Sukrose 20%. Penelitian ini bertujuan membuat standar Hb alternatif, menggantikan standar Hb pabrikan. Penelitian ini adalah eksperimen dengan rancangan *pre and posttest without control group*. PRC limbah darah PMI diolah menjadi hemolisat, ditambah lioprotektan, dilakukan liofilisasi, diperiksa kadar Hb dengan metode Sianmethemoglobin sebagai kelompok *pre test*, disimpan pada suhu 4°C selama enam bulan, diperiksa Kadar Hb dengan metode Sianmethemoglobin sebagai kelompok *post test*. Dilakukan Uji Homogenitas dan Uji Stabilitas sesuai ISO 13528:2015. Rerata kadar Hb liofilisat PRC sebelum disimpan (X_r)=15,06 g/dl, diperoleh $S_s \leq 0,3\sigma_{pt}$, sehingga dinyatakan homogen sesuai nilai keberterimaan homogen menurut ISO 13528:2015. Setelah disimpan selama enam bulan pada suhu 4°C, rerata kadar Hb liofilisat PRC (Y_r)=14,68 g/dl, diperoleh $|X_r - Y_r| \leq 0,3\sigma_{pt}$ sehingga dinyatakan stabil sesuai nilai keberterimaan stabil menurut ISO 13528:2015. Kadar Hb Liofilisat PRC dinyatakan homogen dan stabil selama enam bulan. Standar Hb dari Liofilisat PRC dapat digunakan sebagai alternatif pengganti standar Hb komersial

Kata kunci: hemoglobin, liofilisasi, homogen, PRC, stabilitas

PENDAHULUAN

Anemia merupakan penurunan kadar hemoglobin, hitung eritrosit, dan hematokrit sehingga jumlah eritrosit dan/atau kadar hemoglobin yang beredar tidak dapat memenuhi fungsinya untuk menyediakan oksigen bagi jaringan tubuh. Biasanya anemia ditandai dengan penurunan kadar hemoglobin kurang dari 13,5 g/dL pada pria dewasa dan kurang dari 11,5 g/dL pada wanita dewasa^{1,2,3,4,5,6}.

Berdasarkan Riskesdas 2013, terdapat 37,1% ibu hamil anemia, sedangkan menurut Riskesdas 2018, terdapat 48,9% ibu hamil anemia⁷. Anemia pada ibu hamil di negara berkembang umumnya diduga karena kekurangan zat besi. Menurut definisi WHO, anemia pada kehamilan adalah bila kadar hemoglobin (Hb) < 11 g/dL. Anemia merupakan masalah kesehatan masyarakat karena berhubungan dengan meningkatnya risiko morbiditas dan mortalitas pada saat ibu melahirkan^{8,2}. Ibu hamil yang menderita anemia mempunyai peluang mengalami perdarahan pada saat melahirkan yang dapat berakibat pada kematian⁵.

Beberapa laboratorium di Pusat Kesehatan Masyarakat yang belum memiliki *Automatic Haematology Analyzer*, pemeriksaan kadar Hb dengan metode Sianmethemoglobin, menggunakan Spektrofotometer, membutuhkan pereaksi Drabkin dan standar Hb. Standar Hb komersial yang merupakan impor, sudah tidak diproduksi lagi, sehingga untuk memenuhi kebutuhan standar Hb, digunakan darah kontrol komersial, yang masa kedaluwarsanya hanya satu bulan. ...

Packed Red Cells (PRC) yang sudah kedaluwarsa merupakan limbah Palang Merah Indonesia (PMI), dapat diolah menjadi standar Hb dengan mengolah PRC menjadi hemolisat, ditambah Trehalose 20%, diliofilisasi pada suhu -75°C dan tekanan 0,0012 mbar selama 48 jam. Liofilisat PRC untuk dapat menjadi standar Hb harus memenuhi syarat homogen dan stabil menurut ISO 13528:2015⁹.

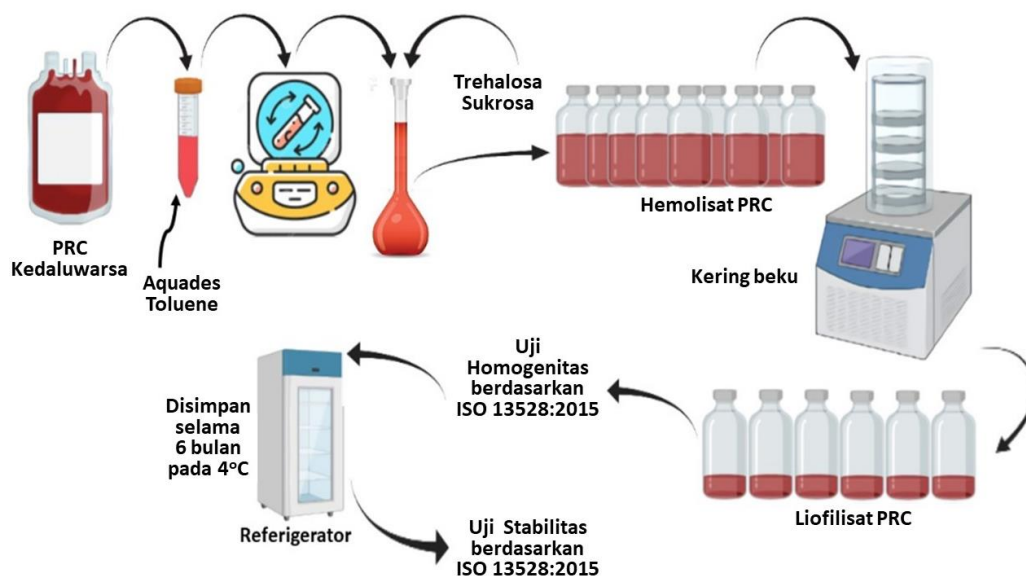
METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan eksperimen. Desain penelitian adalah "*pre and posttest without control grup*". PRC yang kedaluwarsa dicuci dengan NaCl 0,85%, Eritrosit murni yang diperoleh ditambah toluene, dikocok kuat, disentrifus, disaring, didapatkan hemolisat, ditambah Trehalose, dicampur, dimasukkan botol kaca sebanyak 5 ml, tutup rapat, diliofilisasi dengan liofilizer Christ Alpha 1-2 LDplus pada suhu -75°C dan tekanan 0,0012 mBar selama 24 jam.

Liofilisat PRC direkonstitusi dengan menambahkan 1 ml aquabides, dicampur, diamkan 5 menit, dilakukan pemeriksaan kadar Hb metode Sianmethemoglobin, menggunakan spektrofotometer. Prinsip pemeriksaannya ketika darah dicampur dengan larutan kalium sianida, kalium ferisianida, dalam larutan alkali, mengakibatkan eritrosit lisis, sehingga Hb menyebar secara merata. Kalium ferisianida mengubah hemoglobin menjadi methemoglobin, dan methemoglobin bereaksi dengan Kalium sianida menghasilkan sianmethemoglobin yang stabil. Dengan metode ini semua jenis hemoglobin yang ada dalam darah diubah menjadi senyawa tunggal Sianmethemoglobin. Pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ). 540 nanometer^{10,11,12,13,14,15}.

Dilakukan juga pemeriksaan kadar Hb pada darah kontrol komersial, untuk mendapatkan faktor dalam perhitungan kadar Hb. Data Kadar Hb Liofilisat PRC sebelum penyimpanan diuji homogenitasnya menurut ISO 13528:2015. Dilakukan penyimpanan selama enam bulan pada suhu 4°C, dilakukan pemeriksaan kadar Hb, data Kadar Hb Liofilisat PRC setelah disimpan untuk uji stabilitas menurut ISO 13528:2015^{16,17,18,19}.

Penelitian ini dilaksanakan setelah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Poltekkes Kemenkes Yogyakarta no e-KEPK/POLKESYO/0544/VI/2021.



Gambar 1. Diagram Skematis Pembuatan Liofilisat Standar Hb dari PRC Limbah PMI

HASIL

Hasil penelitian berupa Hemolisat PRC tampak pada Gambar 2, dan hasil Liofilisasi Hemolisat PRC menjadi Liofilisat PRC tampak pada Gambar 3.



Gambar 2. Hemolisat PRC sebelum diliofilisasi



Gambar 3. Hemolisat PRC setelah diliofilisasi (Liofilisat PRC)

Hasil pemeriksaan kadar Hb liofilisat PRC sebelum disimpan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kadar Hb (gr%) Liofilisat PRC Sebelum dan Setelah disimpan pada suhu 4°C selama dua bulan

Lama Simpan	N (Duplo)	Kadar Hb (gr/dl)				
		Maksimum	Minimum	Rerata	Simpangan Baku	Koefisien Variasi
0*	10	16,47	14,33	15,06	0,56	0,04
6**	3	15,04	14,48	14,68	0,20	0,01

Keterangan :

*untuk Uji Homogenitas , * dan **untuk Uji Stabilitas

Tabel 2. Kadar Hb (g%) Liofilisat PRC Sebelum Disimpan dan Pehitungan Uji Homogenitas menurut ISO13528:2015

No	Kadar Hb		Xt	Xt - Xr	(Xt-Xr) ²	Wt	Wt ²
Sample	X1	X2					
14	14,33	15,55	14,94	-0,11800	0,01392	1,22000	1,48840
11	14,64	14,79	14,72	-0,34300	0,11765	0,15000	0,02250
33	14,33	14,79	14,56	-0,49800	0,24800	0,46000	0,21160
9	15,1	15,86	15,48	0,422000	0,17808	0,76000	0,57760
1	14,64	14,64	14,64	-0,41800	0,17472	0,00000	0,00000
17	14,64	15,25	14,95	-0,11300	0,01277	0,61000	0,37210
16	16,47	15,86	16,17	1,10700	1,22545	0,61000	0,37210
4	15,1	15,1	15,10	0,04200	0,00176	0,00000	0,00000
40	14,64	15,55	15,10	0,03700	0,00137	0,91000	0,82810
61	14,94	14,94	14,94	-0,11800	0,01392	0,00000	0,00000
	Σ =		150,58	Σ =	1,98766	Σ =	3,87240
	Xr =		15,06	Sx ² =	0,22085	Sw ² =	0,19362
				Sx =	0,46995	Sw ² /2 =	0,09681
					Sx ² -(Sw ² /2)=	0,12404	
					Ss =	0,35219	

Keterangan :

Xt = Rerata kadar Hb liofilisat PRC dari satu vial yang dibagi dua (gr/dl)
 = (Xt,1 + X t,2)/2, dimana hasil uji ke-1 (Xt,1) dan ke-2 (X t,2) dan seterusnya

Xr = Rerata kadar Hb liofilisat PRC
 = ΣXt/g , dimana g adalah jumlah spesimen yang digunakan.

Sx2 = Σ(Xt-Xr)2/(g-1)

Sx = Standar deviasi, $Sx = \sqrt{\frac{\sum (X_{t_i} - X_{r..})^2}{(g-1)}}$

Wt = Selisih kadar Hb liofilisat PRC dari satu vial yang dibagi dua yang dimutlakkan

$Wt = |X_{t,1} - X_{t,2}|$

Sw2= ΣWt2/2g

Sw2/2 = (ΣWt2/2g)/2

Sw = Standar deviasi dalam kelompok sample, $Sw = \sqrt{\sum \frac{W_t^2}{(2g)}}$

Ss = Standar deviasi antar kelompok sample, $S_s = \sqrt{S_x^2 - (\frac{S_w^2}{2})}$

Liofilisat PRC disimpan selama enam bulan pada suhu 4°C, hasil pemeriksaan kadar Hb liofilisat PRC setelah disimpan pada Tabel 4.

Tabel 4. Kadar Hb (gr%) liofilisat PRC metode Sianmethemoglobin setelah disimpan pada suhu 4°C selama enam bulan dan Perhitungan uji Stabilitas menurut ISO13528:2015.

No	No sampel	Kadar Hb (gr/dl)		Yt
		I	II	
1	22	14.56	14.60	14.58
2	34	14.64	14.48	14.56
3	15	14.76	15.04	14.90
Yr				14,68

BAHASAN

Kadar Hb liofilisat PRC (gr/dl) dinyatakan homogen apabila $Ss \leq 0,3\sigma_{pt}$. Penentuan nilai σ_{pt} (*Standard Deviation For Proficiency Test*) dihitung berdasarkan ISO 13528:2015 oleh Horwitz dan dimodifikasi Thompson [16] [17] [18] [19]. Perhitungan nilai σ_{pt} pada Tabel 3. Berdasarkan ISO 13528:2015, kadar Hb liofilisat PRC dinyatakan homogen apabila $Ss \leq 0,3\sigma_{pt}$. Berdasarkan Tabel 3, didapatkan σ_{pt} yang ditetapkan menurut Horwitz dimodifikasi Thomson=3,76100, maka $0,3\sigma_{pt}=1,12830$, $Ss=0,35219$, sehingga Hb liofilisat PRC dinyatakan homogen karena $Ss \leq 0,3\sigma_{pt}$ sesuai ketentuan ISO 13528:2015⁹.

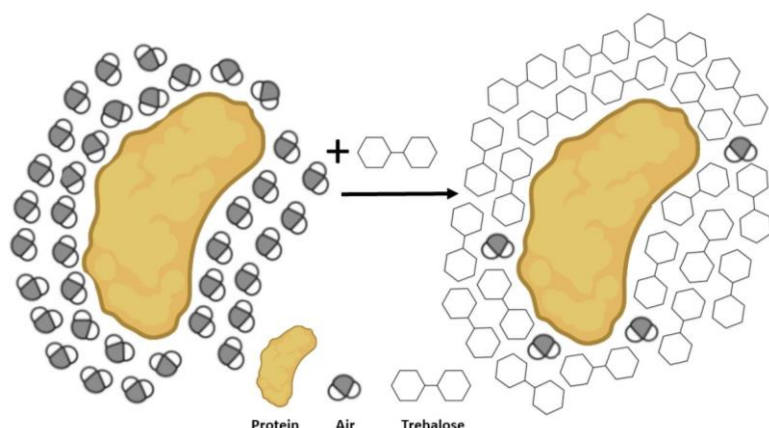
Homogen adalah suatu sifat atau kondisi yang menunjukkan “keserbasamaan” baik jenis maupun kadar dalam suatu bahan atau sampel. Suatu bahan atau sampel yang homogen, jika dianalisis memberikan hasil yang teliti dan tepat. Sebaliknya, bahan atau sampel yang tidak homogen, jika dianalisis memberikan hasil yang beragam (bervariasi). Stabilitas sangat penting untuk bahan standar, karena dengan adanya kestabilan, menunjukkan tidak berubah secara signifikan selama penyimpanan. Uji stabilitas memerlukan beberapa persyaratan antara lain harus digunakan metode pemeriksaan dan dilakukan di laboratorium dan kondisi yang sama dengan uji homogenitas²⁰

Untuk mengetahui kestabilan kadar Hb, dilakukan penyimpanan liofilisat Hb pada 4°C selama enam bulan. Setelah disimpan pada 4°C selama enam bulan, dilakukan pemeriksaan kadar Hb menggunakan metode Sianmethemoglobin, hasil pemeriksaannya tertera pada Tabel 4. Kriteria keberterimaan menurut ISO 13528:2015, kadar Hb liofilisat PRC dinyatakan stabil, apabila $|Xr - r| \leq 0,3\sigma_{pt}$, Xr adalah rerata kadar Hb Liofilisat PRC sebelum disimpan=15,06 gr/dl, Yr adalah rerata kadar Hb Liofilisat PRC setelah disimpan=14,68 gr/dl, $\sigma_{pt}=3,76100$, $0,3\sigma_{pt}=1,12830$, maka $|Xr - Yr| \leq 0,3\sigma$, $|15,06 - 14,68| \leq 1,12830$, maka kadar Hb liofilisat PRC dinyatakan stabil, sebagaimana dipersyaratkan dalam ISO 13528:2015.

Uji Homogenitas dan Stabilitas Kadar Hb Liofilisat PRC dinyatakan homogen dan stabil, sehingga dapat digunakan sebagai standar Hb. Proses kering beku merupakan kombinasi dua teknik penyimpanan jangka panjang yang paling baik, yaitu pembekuan dan pengeringan. Garis besar tahapan proses ini meliputi pembuangan uap air dengan cara sublimasi vakum pada keadaan beku. Proses kering beku banyak digunakan pada pengawetan mikroba. Penambahan lioprotektan Trehalose yang berfungsi secara efektif mempertahankan konformasi protein dan biomolekul lainnya pada saat air mengalami sublimasi selama pengeringan beku.

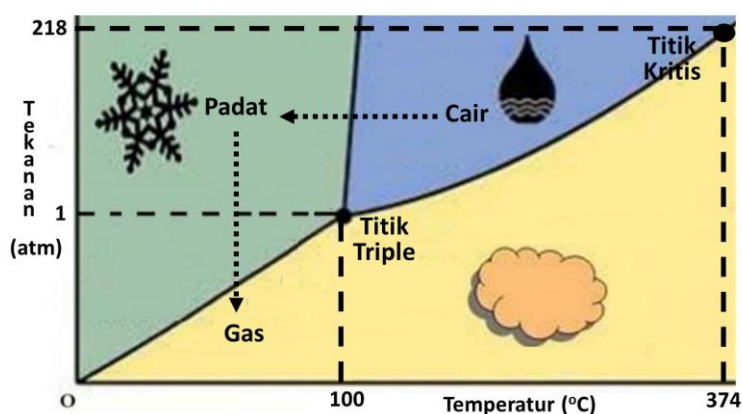
Trehalose adalah Disakarida non-pereduksi yang terdiri dari dua molekul glukosa yang dihubungkan oleh karbon anomerik, dapat memberikan jenis perlindungan selama liofilisasi. D-Trehalose adalah bubuk kristalin dihidrat dengan berat molekul 378,33 g/mol. Ini larut dalam air hingga 6,8% pada 20° C. Trehalose adalah lioprotektan protein yang efektif pada konsentrasi 1-2%²¹.

Lioprotektan Trehalose dapat menstabilkan protein, termasuk Hb, melalui mekanisme penggantian molekul air oleh molekul Trehalose^{22,23}



Gambar 1. Mekanisme penstabilan protein oleh Trehalose²².

Prinsip liofilisasi adalah pada tekanan dan suhu tertentu suatu zat dapat mempunyai beberapa wujud dalam keseimbangan. Misalnya pada tekanan 76 cm Hg dan suhu 00C air dan es (wujud cair dan padat) berada dalam keadaan keseimbangan. Pada keseimbangan itu, sebenarnya setiap saat ada kemungkinan sejumlah butir es berubah menjadi wujud cair. Sebaliknya, dalam waktu yang sama sejumlah butir air berubah wujud menjadi es, sehingga jumlah netto butir air dan es selalu tetap. Hubungan antara tekanan dan suhu keseimbangan zat dapat dilukiskan dalam diagram, seperti pada diagram dibawah ini^{24, 25, 26, 27}.



Gambar 2. Perubahan wujud air pada keadaan cair, padat dan gas pada berbagai tekanan dan suhu²⁷

Pengeringan beku vakum (*freeze vacuum drying*) adalah proses pengeringan yang terjadi pada tekanan rendah atau pada posisi dibawah titik triple point (tekanan 6.1 milibar dan temperatur 0°C). Proses pengeringan vakum dapat menjaga kandungan gizi, bentuk, warna dan kandungan biologis serta struktur produk. Proses pengeringan terdiri dari 3 proses utama yaitu proses pembekuan, proses pengeringan primer dan proses pengeringan sekunder^{28,29}.

SIMPULAN

Pemanfaatan PRC limbah PMI dengan pengolahan dan penambahan lioprotektan Trehalose 2%, Sukrose 20% dan liofilisasi memenuhi persyaratan pada ISO 13528:2015 yaitu homogen dan stabil, sehingga dapat untuk standar Hb

SARAN

Kepada peneliti yang lain dapat melakukan penelitian dengan lama simpan liofilisat PRC yang lebih lama dan temperatur simpan pada suhu ruang, tetapi masih mempunyai sifat homogen dan stabil, sehingga dapat lebih efisien.

RUJUKAN

1. I. P. Lestari, N. I. Lipoeto, and A. Almurdi, "Hubungan Konsumsi Zat Besi dengan Kejadian Anemia pada Murid SMP Negeri 27 Padang," *J. Kesehat. Andalas*, vol. 6, no. 3, p. 507, 2018, doi: 10.25077/jka.v6i3.730.
2. P. Astari, H. T. Rinonce, F. Kasim, M. F. Pudjohartono, J. Debora, and M. G. Winata, "Anemia pada ibu hamil peserta Program 1000 Hari Pertama Kehidupan di Agats, Asmat, Papua: Prevalensi dan analisis faktor risiko," *J. Community Empower. Heal.*, vol. 1, no. 1, pp. 36–44, 2018, doi: 10.22146/jcoemph.39261.
3. Riskesdas, "Riset Kesehatan Dasar Nasional," Riskesdas, p. 63, 2018, [Online]. Available: <https://www.litbang.kemkes.go.id/hasil-utama-riskesdas-2018/>.
4. A. A. Bagu, H. Hariati, and A. I. Thamrin, "Kejadian Anemia pada Ibu Hamil," *J. Ilm. Kesehat.*, vol. 1, no. 1, pp. 8–17, 2019, doi: 10.36590/jika.v1i1.1.
5. I. Tanzih, L. J. Utama, and R. Rosmiati, "Faktor Risiko Anemia Ibu Hamil Di Indonesia," *J. Gizi dan Pangan*, vol. 11, no. 2, pp. 143–152, 2016, doi: 10.25182/jgp.2016.11.2.%p.
6. W. Astriana, "Kejadian Anemia pada Ibu Hamil Ditinjau dari Paritas dan Usia," *J. Aisyah J. Ilmu Kesehat.*, vol. 2, no. 2, pp. 123–130, 2017, doi: 10.30604/jika.v2i2.57.
7. Riskesdas, "HASIL UTAMA RISKESDAS 2018 Kesehatan," p. 200, 2018..
8. K. K. R. Badan Litbang Kesehatan, "Laporan_Nasional_RKD2018_FINAL.pdf," Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. p. 198, 2018, [Online]. Available: http://labdata.litbang.kemkes.go.id/images/download/laporan/RKD/2018/Laporan_Nasional_RKD2018_FINAL.pdf.
9. И. Стандарт, "International Standard ISO 13528:2015," vol. 2016, pp. 2–7, 2016.
10. E. Wittenmeier et al., "Comparison of the gold standard of hemoglobin measurement with the clinical standard (BGA) and noninvasive hemoglobin measurement (SpHb) in small children: A prospective diagnostic observational study," *Paediatr. Anaesth.*, vol. 25, no. 10, pp. 1046–1053, 2015, doi: 10.1111/pan.12683.
11. D. Kumar Jain, "Comparison of automated method and photometric cyanmethemoglobin method for haemoglobin estimation," *IP J. Diagnostic Pathol. Oncol.*, vol. 5, no. 3, pp. 273–276, 2020, doi: 10.18231/j.jdpo.2020.053.
12. T. Srivastava, H. Negandhi, S. B. Neogi, J. Sharma, and R. Saxena, "Methods for Hemoglobin Estimation: A Review of 'What Works,'" *J. Hematol. Transfus.*, vol. 2, no. 3, pp. 2005–2006, 2014.
13. R. D. Whitehead, Z. Mei, C. Mapango, and M. E. D. Jefferds, "Methods and analyzers for hemoglobin measurement in clinical laboratories and field settings," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1450, no. 1, pp. 147–171, 2019, doi: 10.1111/nyas.14124.
14. B. Nkrumah et al., "Hemoglobin estimation by the HemoCue portable hemoglobin photometer in a resource poor setting," *BMC Clin. Pathol.*, vol. 11, no. 1, p. 5, 2011, doi: 10.1186/1472-6890-11-5.
15. Z. Török et al., "Preservation of trehalose-loaded red blood cells by lyophilization," *Cell Preserv. Technol.*, vol. 3, no. 2, pp. 96–111, 2005, doi: 10.1089/cpt.2005.3.96.

16. A. Asiah, "Pemetaan Kompetensi Laboratorium Lingkungan Melalui Program Uji Profisiensi Logam Berat Dalam Air Bersih," *J. Ecolab*, vol. 11, no. 2, pp. 82–91, 2017, doi: 10.20886/jklh.2017.11.2.82-91.
17. S. K. Wong, "Review of the new edition of ISO 13528," *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 21, no. 4, pp. 249–254, 2016, doi: 10.1007/s00769-016-1217-9.
18. British Standards Institution, "Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison," *Br. Stand. Publ.*, vol. BS ISO 135, no. March, pp. 1–16, 2015.
19. J. C. Gust, "A Discussion of Stability and Homogeneity Issues in Proficiency Testing for Calibration Laboratories," *NCSLI Meas.*, vol. 4, no. 1, pp. 60–67, 2009, doi: 10.1080/19315775.2009.11721461.
20. International Organization for Standardization (ISO), "ISO 13528: Statistical methods for use in proficiency testing," vol. 2005, p. 76, 2005.
21. N. K. Jain and I. Roy, "Effect of trehalose on protein structure," *Protein Sci.*, vol. 18, no. 1, pp. 24–36, 2009, doi: 10.1002/pro.3.
22. V. M. Balcão and M. M. D. C. Vila, "Structural and functional stabilization of protein entities: State-of-the-art," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 93, pp. 25–41, 2015, doi: 10.1016/j.addr.2014.10.005.
23. K. Möbius et al., "Soft Dynamic Confinement of Membrane Proteins by Dehydrated Trehalose Matrices: High-Field EPR and Fast-Laser Studies," vol. 51, no. 9–10, 2020.
24. A. Bansal, S. Lale, and M. Goyal, "Development of lyophilization cycle and effect of excipients on the stability of catalase during lyophilization," *Int. J. Pharm. Investig.*, vol. 1, no. 4, p. 214, 2011, doi: 10.4103/2230-973x.93007.
25. B. Luy and H. Stamato, "Spray freeze drying," *Dry. Technol. Biotechnol. ...*, 2020, [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527802104.ch8>.
26. D. Fissore, "Freeze-drying of pharmaceuticals," *Encycl. Pharm. Sci. ...*, 2013, [Online]. Available: <https://api.taylorfrancis.com/content/chapters/edit/download?identifierName=doi%5C&identifierValue=10.1081/E-EPT4-120050278%5C&type=chapterpdf>.
27. K. A. Gaidhani, M. Harwalkar, D. Bhambere, and P. S. Nirgude, "Lyophilization / Freeze Drying- a Review," Kunal al. *World J. Pharm. Res. World J. Pharm. Res. SJIF Impact Factor* 5, vol. 4, no. 8, p. 517, 2015, Accessed: May 14, 2021. [Online]. Available: www.wjpr.net.
28. D. Bisht and Z. Iqbal, "Lyophilization - Process and Optimization for Pharmaceuticals," *Int. J. Drug Regul. Aff.*, vol. 3, no. 1, pp. 30–40, 2018, doi: 10.22270/ijdra.v3i1.156.
29. S. Patro and B. S. Chang, "Freeze-drying process development for protein pharmaceuticals," *Lyophilization Biopharm.*, pp. 113–138, 2004.