



UNIVERSITAS INDONESIA

**PERBANDINGAN DIAMETER LIPOSOM EPC-TEL 2,5 YANG
TERPAPAR LARUTAN CaCl_2 DAN NaCl 150 MOSMOL PH 7
SECARA KUANTITATIF**

SKRIPSI

**ANDITA DWI HIDAYATI
010500022Y**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER UMUM
JAKARTA
MARET 2009**



**PERBANDINGAN DIAMETER LIPOSOM EPC-TEL 2,5 YANG
TERPAPAR LARUTAN CaCl_2 dan NaCl 150 mOsmol pH 7
SECARA KUANTITATIF**

OLEH :

**Andita Dwi Hidayati
010500022Y**

SKRIPSI

**Untuk Memenuhi Persyaratan Kelulusan
sebagai Sarjana Kedokteran
pada
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA, MARET 2009**

LEMBAR PENGESAHAN

NAMA : ANDITA DWI HIDAYATI

NPM : 010500022Y

INSTITUSI : FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA

JUDUL PENELITIAN :

**PERBANDINGAN DIAMETER LIPOSOM (EPC-TEL 2,5) YANG TERPAPAR
LARUTAN CaCl₂ dan NaCl 150 mOsmol pH 7
SECARA KUANTITATIF**

Dosen Pembimbing

Dr. dr. Ernie H. Purwaningsih, MS
NIP. 130 810 259

Ketua Modul Riset

Dr. dr. Saptawati Bardosono M.Sc
NIP. 140102741

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena atas rahmat dan petunjuk-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Skripsi yang berjudul **“Perbandingan Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Yang Terpapar Larutan CaCl₂ dan NaCl 150 mOsmol pH 7 Secara Kuantitatif”** ini penulis susun sebagai usaha untuk mengetahui nilai ukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan pemaparan garam Kalsium klorida (CaCl₂) dan Natrium klorida (NaCl) 150 mOsmol pada pH 7 selama penyimpanan 90 hari pada suhu 4° C yang diukur secara kuantitatif dengan program *Image Pro Express 4.5*. Data mengenai kegunaan *Image Pro Express 4.5* dalam pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2,5 di harapkan dapat memberikan manfaat bagi dunia kedokteran.

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. dr. Ratna Sitompul, SpM (K) selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI);
2. Dr. dr. Ernie H. Purwaningsih, MS selaku dosen pembimbing, dan penanggungjawab penelitian ini, yang dengan sabar telah membimbing penulis dalam pelaksanaan penelitian ini;
3. Dr. dr. Saptawati Bardosono M.Sc. Ph.D selaku ketua Modul Riset FKUI;
4. Kedua orang tua yang telah memberikan dukungan kepada penulis;
5. Rekan-rekan FKUI angkatan 2005 yang telah memberi dukungan dan bantuan selama penelitian ini;
6. Pihak-pihak lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, *tiada gading yang tak retak*. Demikian pula dengan skripsi ini yang masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang konstruktif sangat penulis harapkan.

Jakarta, Maret 2009

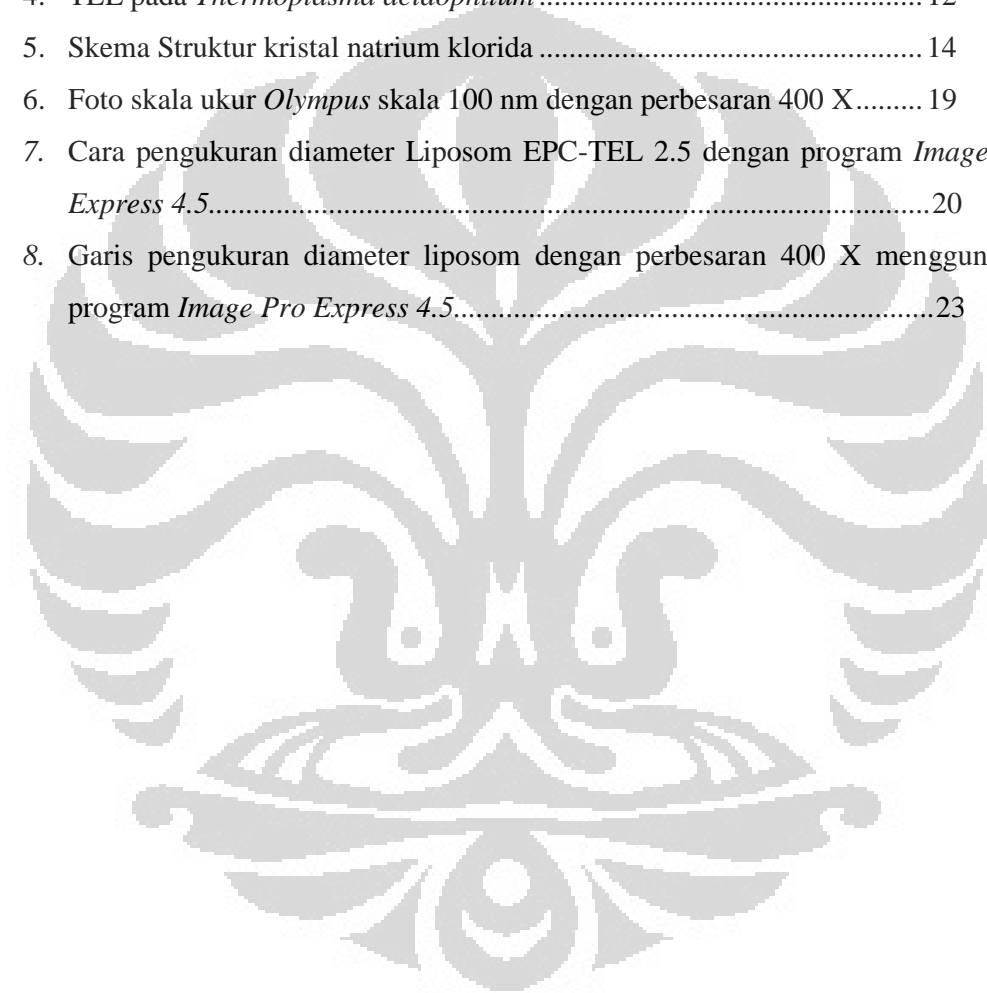
Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR SINGKATAN.....	vi
ABSTRAK	vii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis	5
1.5 Manfaat penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Liposom.....	6
2.1.1 Karakteristik Liposom	7
2.1.2 Produksi Liposom.....	9
2.1.3 Liposom Sebagai Pembawa obat.....	10
2.2 Tetra Eter Lipid (TEL)	11
2.3 Image Pro Express 4.5.....	13
2.4 Natrium Klorida (NaCl).....	14
2.5 Kalsium Klorida (CaCl ₂).....	15
BAB III METODE PENELITIAN	16
3.1 Desain Penelitian.....	16
3.2 Waktu dan Tempat	16
3.3 Besar Populasi dan sampel	16
3.4 Besar sampel	16
3.5 Cara pengambilan sampel	17
3.6 Alat dan Bahan	18
3.7 Cara Kerja	18
3.8 Analisis data.....	20
3.9 Kerangka konsep.....	21
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	22
4.1 Hasil Penelitian.....	22
4.2 Pembahasan	23
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	27
5.1 Kesimpulan.....	27
5.2 Saran.....	28
DAFTAR PUSTAKA	29
LAMPIRAN I	35

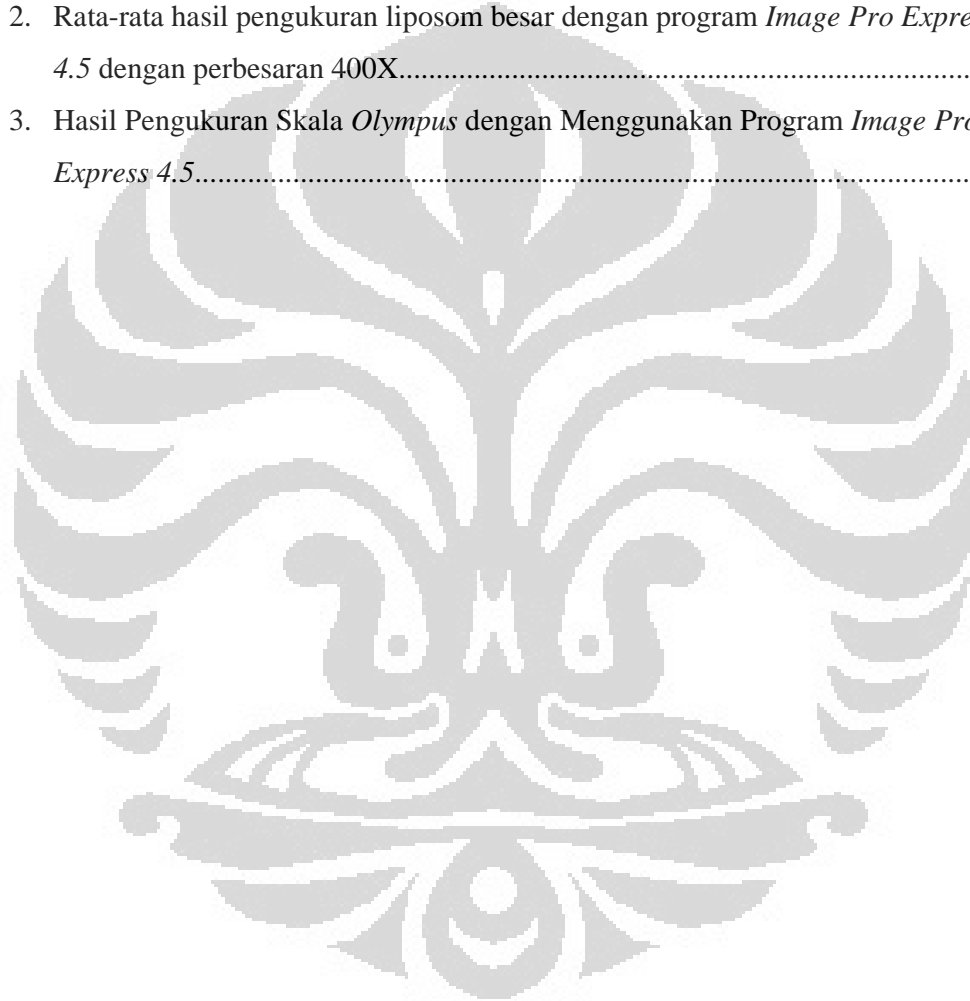
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Vesikel dwilapis lipid liposom	7
2. Liposom dengan menggunakan mikroskop elektron.....	7
3. Liposom sebagai pembawa obat.....	11
4. TEL pada <i>Thermoplasma acidophilum</i>	12
5. Skema Struktur kristal natrium klorida	14
6. Foto skala ukur <i>Olympus</i> skala 100 nm dengan perbesaran 400 X.....	19
7. Cara pengukuran diameter Liposom EPC-TEL 2.5 dengan program <i>Image Pro Express 4.5</i>	20
8. Garis pengukuran diameter liposom dengan perbesaran 400 X menggunakan program <i>Image Pro Express 4.5</i>	23



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rata-rata hasil pengukuran liposom kecil dengan program <i>Image Pro Express 4.5</i> dengan perbesaran 400X.....	22
2. Rata-rata hasil pengukuran liposom besar dengan program <i>Image Pro Express 4.5</i> dengan perbesaran 400X.....	22
3. Hasil Pengukuran Skala <i>Olympus</i> dengan Menggunakan Program <i>Image Pro Express 4.5</i>	23



DAFTAR SINGKATAN

CaCl ₂	Calcium Chloride
DNA	deoxyribonucleic acid
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
EPC	Egg-yolk Phosphatidyl Choline
IUV	Intermediate-sized Unilamellar Vesicles
LMV	Large multilamellar vesicles
MPLP	Metil Prednisolon Palmitat
mOsmol	miliomolaritas
NaCl	Natrium Chloride
nm	nanometer
µm	micrometer
PLFE	Polar Lipid Fraction E
SPC	Soy-bean Phosphatidyl-choline
SUV	Small unilamellar vesicles
TEL	Tetra ether lipid



ABSTRAK

Liposom dengan perannya sebagai pembawa obat terbukti meningkatkan efektivitas sekaligus mengurangi efek samping obat dan mengurangi efek sistemik, terutama pada terapi jangka panjang. Liposom merupakan partikel berbentuk vesikel yang dindingnya tersusun atas molekul lipid (konstituen utamanya adalah fosfolipid) lapis ganda yang membungkus kompartemen cairan didalamnya. Liposom yang sedang dikembangkan merupakan kombinasi fosfatidil kolin kuning telur (*Egg-yolk Phosphatidyl Choline / EPC*) dan Tetraeter Lipid 2,5 mol % dari *Thermoplasma acidophilum* yang selanjutnya disebut sebagai liposom EPC-TEL 2,5. **Tujuan:** Mengukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi yang terpapar dengan larutan CaCl_2 150 mOsmol pada pH 7 dan NaCl 150 mOsmol pada pH 7 selama 90 hari penyimpanan secara kuantitatif menggunakan program *Image Pro Express 4.5*. **Metode:** Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental dengan mengukur dan membandingkan diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi yang terpapar CaCl_2 dan NaCl 150 mOsmol pada pH 7, suhu 4°C . Pengukuran dilakukan pada hasil data hari ke-0 dan hari ke-90 dari dokumentasi penelitian sebelumnya dengan program *Image Pro Express 4.5*. **Hasil dan kesimpulan:** Tidak terdapat perbedaan nilai ukur diameter yang bermakna antara liposom EPC-TEL 2,5 paparan NaCl dan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 hari ke-0 dengan hari ke-90. Pada paparan NaCl 150 mOsmol pH 7, diameter rata-rata untuk liposom kecil hari ke-0=64,77 nm; hari ke-90=80,88 nm ($p=0,089$), dan liposom besar hari ke-0=tidak ada data; hari ke-90=125,35 nm. Pada paparan CaCl_2 150 mOsmol pH 7, diameter rata-rata liposom kecil hari ke-0=71,30 nm; hari ke-90=67,45 nm ($p=0,459$) dan liposom besar hari ke-0=115,75 nm; hari ke-90=124,08 nm ($p=0,087$). Pada perbandingan diameter liposom paparan NaCl dengan hasil paparan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 pada hari ke-90 didapatkan hasil yang tidak bermakna; yaitu diameter rata-rata untuk liposom kecil NaCl=80,88 nm; liposom kecil CaCl_2 =67,45 nm ($p=0,076$), dan untuk liposom besar NaCl=115,75 nm; liposom besar CaCl_2 =124,08 nm ($p=0,810$). Program *Image Pro Express 4.5* dapat digunakan untuk mengukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan paparan garam kalsium klorida (CaCl_2) 150 mOsmol pada pH 7 dan garam natrium klorida (NaCl) 150 mOsmol pada pH 7 secara lebih sensitif, cepat, dan akurat.

Kata kunci: *Liposom, EPC-TEL 2,5, Thermoplasma acidophilum, NaCl, CaCl₂, Image Pro Express 4.5*

ABSTRACT

Background: As a drug carrier, liposomes has been proved increasing the efficacy and decreasing the adverse effect of drugs in long term therapy. Liposome is a vesicle consisting of an aqueous core enclosed in one or more phospholipid layers as a major constituent. Liposome which has still developed is liposome that manufactured from combination of Egg-yolk Phosphatidyl Choline (EPC) with Tetraeter Lipid 2,5 mol % isolated from *Thermoplasma acidophilum*, which is known as liposome EPC-TEL 2,5.

Objective: To measure quantitatively diameter of liposome EPC-TEL 2,5 after sonication and exposed by electrolite solution, CaCl₂ and NaCl 150 mOsmol pH 7 for 90 days conservation using Image Pro Express 4.5. programme. **Method:** This research is experimental study measuring and comparing liposome's diameter after sonication and has been exposed by electrolite solution of CaCl₂ and NaCl. Measurement is performed on the data day 0 and day-90th documentation from the previous study with Image pro express 4.5. **Result and Conclusion:** There is no significant difference of diameter between liposome that exposed with NaCl and CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 on day 0 compared to day-90th. For liposome that exposed with CaCl₂ 150 mOsmol pH 7, average diameter for small liposome on day 0= 64,77 nm; day-90th=80,88 nm (p=0,089) and for big liposome on day-0= no data; day-90th=125,35 nm. For liposome that exposed with CaCl₂ 150 mOsmol pH 7, average diameter for small liposome on day 0= 71,30 nm; day-90th=67,45 nm (p=0,459) and for big liposome on day-0=115,75 nm; day-90th=124,08 nm (p=0,087). Moreover, there is no significant difference for liposome's diameter between liposome-NaCl exposed compared to liposome-CaCl₂ exposed 150 mOsmol pH 7 on day 90th; for small liposome NaCl= 80,88 nm; small liposome CaCl₂=67,45 nm (p=0,076), and for big liposome NaCl=115,75 nm; big liposome CaCl₂=124,08 nm (p=0,810). Programme Image Pro Express 4.5 can be used to measure the diameter of liposome EPC-TEL 2.5 results from sonication with the exposed of calcium chloride salt (CaCl₂) 150 mOsmol in pH 7 and salt Sodium chloride (NaCl) 150 mOsmol in pH 7 more sensitive, rapid, and accurate.

Keywords: *Liposomes, EPC-TEL 2,5, Thermoplasma acidophilum, NaCl, CaCl₂, Image Pro Express 4.5*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Untuk dapat memberikan efek yang diinginkan, obat harus dapat mencapai tempatnya bekerja. Agar obat mudah mencapai sasaran atau langsung mencapai sasaran, dibutuhkan suatu sediaan berupa pembawa obat (*drug-carrier*). Upaya menghantarkan obat langsung mencapai ke sasaran atau ke reseptor adalah untuk meminimalisir berbagai masalah terapi¹.

Salah satu masalah terapi yang muncul pada pemberian obat secara sistemik antara lain adalah dosis terapi. Dosis terapi menjadi meningkat terutama bila diberikan jangka panjang, misalnya pada kasus-kasus tertentu seperti kanker atau tumor¹. Tanpa menggunakan pembawa obat, dosis terapi yang diberikan jadi lebih tinggi agar bisa mencapai target sesuai dengan dosis yang tepat. Pemberian dosis obat yang tinggi dikarenakan banyak kandungan senyawa aktif obat memiliki availabilitas yang rendah dalam darah. Dosis terapi yang tinggi akan meningkatkan efek samping obat. Selain itu, pemberian obat secara sistemik tanpa langsung tertuju ke sasaran akan berpengaruh pada semua organ termasuk organ yang bukan sasaran, sehingga kemungkinan akan timbul reaksi obat yang tidak diinginkan. Untuk itu, diperlukan sistem pembawa obat yang tepat dan sesuai untuk meminimalisir hal tersebut¹⁻³.

Banyak faktor pertimbangan dalam memilih dan menggunakan pembawa obat. Faktor-faktor yang perlu diperhatikan dalam memilih sediaan pembawa obat adalah struktur, sifat fisik dan kimiawi, bentuk dan letak reseptor, dan interaksi yang mungkin terjadi antara pembawa obat dengan obat atau pembawa obat dan target. Hal lain yang tidak kalah penting adalah pembawa obat sebaiknya bersifat biokompatibel, mudah didegradasi dalam tubuh, tidak mutagenik, tidak toksik terhadap tubuh, dan tidak memicu respon imun atau imunogenik^{4,5}.

Liposom merupakan salah satu pendekatan untuk memecahkan masalah tersebut. Selama lebih dari tiga dekade liposom diperkenalkan, diteliti serta terus dikembangkan sebagai pembawa obat. Banyak pula penelitian tentang liposom yang telah dilakukan guna menemukan suatu sediaan yang tepat sesuai dengan tujuan penggunaan pembawa obat. Liposom memiliki sifat-sifat yang memenuhi persyaratan sebagai pembawa obat. Liposom

terdiri dari lipid endogen yang dapat didegradasi oleh tubuh, yang relatif tidak toksik, dan bisa ditoleransi dengan baik oleh tubuh manusia^{4,5}.

Dengan menggunakan liposom sebagai pembawa obat, dosis terapi suatu obat dapat dicapai tanpa harus diberikan dalam dosis tinggi. Hal ini sangat bermanfaat dalam meningkatkan efisiensi obat dan diharapkan dapat mengurangi toksisitas terapeutik^{6,7}.

Dalam perannya sebagai pembawa obat, liposom harus memiliki sifat stabil baik secara fisik, kimia, maupun biologi. Kestabilan liposom secara kimia dapat dilihat dengan menggunakan percobaan pemaparan garam-garam fisiologis seperti, Na⁺, Ca²⁺, dan Cl⁻ (komponen elektrolit utama dalam tubuh manusia)^{8,9}.

Kestabilan merupakan syarat yang penting yang harus dimiliki pembawa obat untuk mengantarkan obat yang dibawanya selama perjalanan ke tempat yang ditujunya, terutama untuk protein yang dapat mudah didegradasi. Formulasi liposom konvensional yang telah ada memiliki stabilitas yang rendah, hal ini telah dibuktikan oleh Patel dan kawan-kawan¹⁰. Oleh karena itu perlu ditambahkan bahan-bahan stabilisator untuk meningkatkan stabilitas liposom. Usaha-usaha tersebut antara lain dengan cara menambahkan lipid bermuatan seperti fosfatidilserin atau fosfatidilgliserol, dengan menginkorporasikan kolesterol ke dalam membran dwilapis, atau dengan menyelubungi permukaan liposom dengan polimer lain^{8,10}. Beberapa zat yang sering digunakan untuk meningkatkan stabilitas liposom yakni asam fosfatidat¹¹, kombinasi vitamin E dan vitamin A¹².

Dalam penelitian sebelumnya, Venessa¹³ pada uji stabilitas liposom yang terpapar pada garam fisiologis, liposom yang digunakan adalah liposom hasil kombinasi antara fosfatidil kolin kuning telur (*Egg yolk Phosphatidyl Choline / EPC*) dengan Tetraeter Lipid yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum* dengan kadar 2,5 mol%^{13,14}. Hasil formulasi ini menghasilkan liposom yang diberi nama liposom EPC-TEL 2,5. Untuk mendapatkan ukuran liposom yang diinginkan yakni <100 nm, dapat dilakukan sonikasi atau ekstrusi membran. Pada penelitian tersebut, dilakukan tehnik sonikasi dalam air. Penambahan TEL pada formulasi liposom dimaksudkan untuk meningkatkan kestabilan liposom. Menurut beberapa penelitian yang telah dilakukan, liposom ini telah terbukti dapat meningkatkan efek terapi imunologik obat metilprednisolon palmitat dan terdistribusi dengan baik dalam organ^{14,15,16}.

Penelitian tersebut¹³ telah membuktikan bahwa liposom EPC-TEL 2,5 stabil secara kimia tanpa dipengaruhi jenis garam dalam waktu penyimpanan 90 hari pada suhu 4⁰ C pada pH netral¹³. Parameter kestabilannya adalah dengan melakukan pengukuran yang dilakukan baik secara kualitatif maupun kuantitatif pada diameter liposom. Liposom yang stabil akan menunjukkan hasil diameter yang tidak bertambah⁸. Namun, karena pengukuran diameter liposom tersebut menggunakan tehnik berdasarkan skala *olympus* yang dikerjakan secara manual dan data yang diperoleh merupakan data ordinal atau kategorik maka hasil pengukuran tersebut kurang sensitif.

Teknik yang paling akurat mengukur diameter liposom adalah dengan menggunakan alat *particle sizer*^{17,18}, namun harga alat tersebut yang sangat mahal, sehingga dibutuhkan metode lain untuk digunakan sebagai pengukur diameter liposom.

Saat ini, para ahli telah mengembangkan suatu program yang dapat melakukan pengukuran sel secara kuantitatif, yaitu *Image Pro Express 4.5*^{18,19}. Namun, belum ada satupun penelitian dengan menggunakan program tersebut untuk mengukur diameter liposom. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi setelah liposom tersebut terpajan dengan garam NaCl, MgCl₂, CaCl₂ pada pH netral dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5* yang lebih sensitif dan akurat bila dibandingkan dengan tehnik pengukuran secara manual yaitu dengan membandingkan foto liposom dengan skala *olympus*. Hasil pengukuran dengan metode menggunakan program *Image Pro Express 4.5* diharapkan dapat digunakan untuk pengukuran diameter liposom pada uji stabilitas liposom terhadap paparan bahan kimia lain ataupun fisik.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang masalah di atas dan mengingat bahwa diameter liposom belum pernah diukur dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5* yang umumnya digunakan untuk mengukur diameter sel, maka dapat dirumuskan beberapa pertanyaan penelitian sebagai berikut:

1. Apakah diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan pemaparan CaCl₂ 150 mOsmol pada pH 7 selama penyimpanan 90 hari pada suhu 4⁰ C dapat diukur secara kuantitatif dengan program *Image Pro Express 4.5*?

2. Apakah diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan pemaparan NaCl 150 mOsmol pada pH 7 selama penyimpanan 90 hari pada suhu 4° C dapat diukur secara kuantitatif dengan program *Image Pro Express 4.5*?
3. Apakah terdapat perbedaan nilai ukur diameter antara liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi paparan NaCl 150 mOsmol pada pH 7 hari ke-1 pada suhu 4° C dibandingkan dengan liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi paparan NaCl hari ke-90 pada suhu 4° C?
4. Apakah terdapat perbedaan nilai ukur diameter antara liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi paparan CaCl₂ 150 mOsmol pada pH 7 hari ke-1 pada suhu 4° C dibandingkan dengan liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi paparan CaCl₂ hari ke-90 pada suhu 4° C?
5. Apakah terdapat perbedaan nilai ukur antara diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi yang dipaparkan NaCl 150 mOsmol pH 7 pada hari ke-90 dengan liposom yang dipaparkan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 pada hari ke-90.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan Umum: Mengukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi secara kuantitatif.

Tujuan Khusus:

1. Membuktikan bahwa program *Image Pro Express 4.5* dapat mengukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi yang terpapar garam fisiologis NaCl dan CaCl₂ pada pH 7 selama penyimpanan 90 hari pada suhu 4° C lebih akurat dan sensitif bila dibandingkan dengan pengukuran secara kualitatif.
2. Membandingkan hasil pengukuran diameter antara liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi paparan NaCl hari ke-1 dengan liposom EPC-TEL 2,5 paparan NaCl 150 mOsmol pada pH 7 hari ke-90 pada suhu 4° C.
3. Membandingkan hasil pengukuran diameter antara liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi paparan CaCl₂ hari ke-1 dengan liposom EPC-TEL 2,5 paparan CaCl₂ 150 mOsmol pada pH 7 hari ke-90 pada suhu 4° C.

4. Membandingkan hasil pengukuran diameter antara liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi paparan NaCl dengan liposom EPC-TEL 2,5 paparan CaCl₂ 150 mOsmol pada pH 7 pada hari ke-90 pada suhu 4° C.

1.4. Hipotesis

Hipotesis I :

Terdapat perbedaan nilai ukur diameter antara liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi paparan NaCl 150 mOsmol pH 7 hari ke-1 dengan diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi paparan NaCl 150 mOsmol pH 7 hari ke-90.

Hipotesis II:

Terdapat perbedaan nilai ukur diameter antara liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi paparan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 hari ke-1 dengan diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi paparan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 hari ke-90.

Hipotesis III:

Terdapat perbedaan nilai ukur antara diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi yang dipaparkan NaCl 150 mOsmol pH 7 dengan liposom yang dipaparkan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 pada hari ke-90.

1.5. Manfaat Penelitian

1. Bila liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dapat diukur secara kuantitatif dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5*, maka program tersebut dapat digunakan sebagai alat bantu untuk menguji stabilitas liposom secara kimia maupun fisika dengan cara mengukur diameter liposom.
2. Didapatkannya suatu metode alternatif pengukuran liposom yang memiliki keakuratan dan sensitivitas yang lebih baik bila dibandingkan dengan teknik kuantitatif.
3. Didapatkannya suatu metode alternatif pengukuran liposom yang memiliki keakuratan dan sensitivitas yang hampir serupa dengan alat *particle sizer*, namun mudah dan lebih ekonomis.

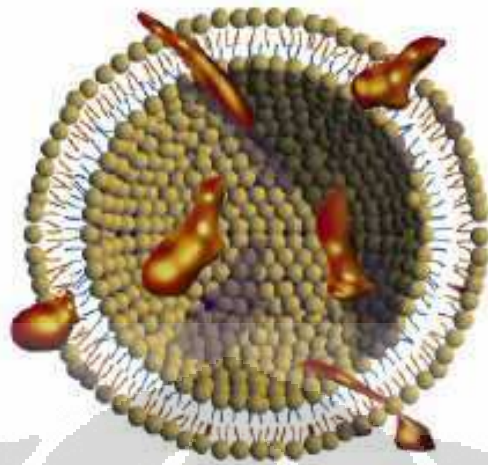
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Liposom

Liposom merupakan partikel berbentuk vesikel yang dindingnya tersusun atas molekul lipid (konstituen utamanya adalah fosfolipid) lapis ganda yang membungkus kompartemen cairan didalamnya^{7,21,22}. Fosfolipid merupakan molekul yang memiliki kepala dan ekor. Bagian kepala merupakan bagian yang bersifat hidrofilik atau menarik air. Sedangkan bagian ekor merupakan bagian yang menolak air karena terbuat dari hidrokarbon^{21,22}. Saat membran fosfolipid terdispersi ke dalam media cair, mereka dapat menyusun ulang dirinya sendiri menjadi partikel kecil bentuk bulat yang didalamnya terdapat droplet cairan dengan membran lapis ganda atau lapis tunggal. Inilah yang disebut sebagai liposom. Vesikel yang terbentuk pun memiliki ukuran yang beragam^{21,23,24}.

Sejak ditemukan pertama kali di Inggris pada tahun 1960 oleh Alec D. Bangham⁷, liposom telah digunakan sebagai model biomembran. Selain itu, penggunaan liposom sebagai karier non toksik untuk alat diagnostik dan pembawa obat biokompatibel untuk meningkatkan potensi dan mengurangi toksisitas terapeutik mulai dikenal²⁵. Namun, pemakaian liposom sebagai sistem pembawa obat baru terealisasi pada tahun 1960⁷.

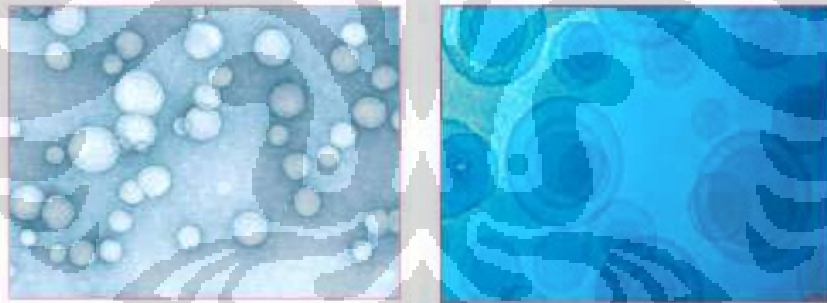
Liposom dapat dibuat dari bahan alami yang berupa turunan alami fosfolipid yang dicampur dengan rantai lemak (misalkan fosfatidilkolin) dengan cara didispersikan²⁶. Karena terbuat dari bahan alami, sehingga membran yang terbentuk menyerupai lipid membran sel dan bersifat biokompatibel (biodegradasi, nontoksik, dan tidak memicu respon imun²⁷). Dalam fungsinya sebagai pengantar obat, selain meningkatkan efektivitas kerja obat dan biokompatibel, liposom juga melindungi jaringan yang sehat dari pengaruh obat toksik. Kelebihan inilah yang membuat liposom menjadi pilihan yang aman dan efektif dalam pemanfaatannya di dunia medis²¹⁻²⁴. Struktur liposom digambarkan secara skematis pada Gambar 1.



Gambar 1: Vesikel dwilapis lipid liposom²⁶

2.1.1 Karakteristik Liposom

Liposom terbuat dari bahan campuran lemak dalam lingkungan air yang kemudian di-sonikasi (dikocok dengan menggunakan gelombang frekuensi tinggi) untuk menghasilkan suatu dispersi vesikel tertutup berukuran kecil untuk kemudian dimanfaatkan^{4,27}.



Gambar 2: Liposom dengan menggunakan mikroskop elektron²⁸

Secara umum, liposom tersusun atas lipid yang menyerupai membran sel (fosfolipid dan kolesterol). Komponen utama penyusun liposom adalah fosfolipid²⁹. Fosfolipid merupakan jenis lipid polar dan bersifat amfipatik – memiliki dua sisi, yakni *water-soluble* (hidrofilik) dan *fat-soluble* (hidrofobik). Di dalam sistem cair, lipid polar secara spontan terdispersi dengan ekor hidrokarbon lipid yang tersembunyi dari lingkungan cair dan kepala hidrofilik yang bermuatan listrik terbuka pada permukaan dan bersinggungan dengan medium cair. Fosfolipid utama yang ditemukan dalam membran adalah fosfogliserida yang merupakan hasil turunan dari alkohol. Sebagian fosfogliserida merupakan derivat dari

senyawa fosfatidat. Gugus fosfat pada fosfatidat teresterifikasi dengan gugus hidroksil alkohol pada bagian polarnya (serin, etanolamin, kolin, gliserol, dan inositol)^{27,30,31,32}.

Jenis fosfolipid yang bisa dimanfaatkan dalam pembentukan liposom diantaranya, dari golongan lipid yang bermuatan negatif, fosfolipid asam, misalnya dipalmitoil-fosfatidilgliserol (DPPG) dan dipalmitoil-fosfatidilkolin (DPPC); dari golongan lipid yang bermuatan netral semisal sfingomielin dan fosfatidiletanolamin³³⁻³⁵. Lipid yang paling sering digunakan dalam pembuatan liposom adalah fosfatidilkolin. Fosfatidilkolin atau lesitin adalah senyawa fosfogliserol yang mengandung kolin. Fosfatidilkolin diperoleh dari kuning telur (*Egg-yolk Phosphatidyl-Choline/EPC*), otak, kedelai (*Soy-bean Phosphatidyl-choline / SPC*) atau yang dibuat secara sintetik³⁴⁻³⁶.

Komponen penyusun liposom lainnya adalah kolesterol. Kolesterol berinteraksi dengan fosfolipid pada membran liposom. Kolesterol dapat meningkatkan stabilitas, menurunkan porositas atau kebocoran melalui membran, dan mencegah agregasi dan fusi dari liposom. Lipid lain yang dapat ditambahkan sebagai stabilisator membran liposom yang sedang dikembangkan adalah tetraeter lipid (TEL) dari membran Archaea. Membran Archea bisa bersumber dari *Thermoplasma acidophilum* dan *Sulfolobus acidocaldarius*^{34,37-40}.

Liposom dapat diproduksi dalam bentuk vesikel unilamellar maupun multilamellar^{6,41}. Vesikel multilamellar merupakan liposom multikompartemen dengan ukuran vesikel antara 100 nm sampai dengan 1000 nm dan setiap vesikel biasanya terdiri atas lima atau lebih lamela konsentris. Dalam proses pembentukannya, dihasilkan liposom dengan berbagai ukuran yang mana akan menjadi dasar klasifikasi^{6,34,42}:

a. *Small Unilamellar Vesicles (SUV)*

SUV memiliki variasi ukuran yang terkecil. Ukuran SUV didasarkan pada kekuatan ionisasi medium cair dan komposisi lemak pada membran, yaitu ukuran vesikel ± 15 nm untuk liposom yang berasal dari lesitin telur murni pada salin normal dan ± 25 nm untuk liposom DPPC.

b. *Large Lamellar Vesicles (LUV)*

Adalah vesikel yang memiliki ukuran lebih besar dari SUV. Liposom ini memiliki ukuran 500-1000 nm. Vesikel jenis ini dapat dibuat dengan metode injeksi eter dan fusi liposom jenis SUV dengan diinduksi kalsium.

c. *Intermediate-sized Unilamellar Vesicles (IUV)*

Liposom ini berukuran 100 nm. Biasanya vesikel ini berukuran 100 s.d. 200 nm dan dapat dibuat dengan ekstruksi tekanan tinggi / dialisis detergen. Vesikel ini dapat bertahan lebih lama dalam sirkulasi dan stabilitasnya baik sehingga sangat bermanfaat dalam bidang farmasi sebagai pembawa obat.

Penelitian Hamada²², telah menunjukkan bahwa ukuran liposom mempengaruhi distribusi liposom dan bersihan darah setelah pemberian secara sistemik^{7,22}. Diameter atau ukuran liposom sangat ditentukan oleh beberapa hal, antara lain: 1) Jenis lipid dan kombinasinya. Sebagai contoh, liposom yang terbuat dari campuran EPC dan kolesterol, berdiameter lebih besar (\pm 100-200 nm) dibandingkan dengan liposom dari EPC saja (< 100 nm); 2) Keseimbangan antara energi untuk membuka membran liposom, elastisitas kelengkungan liposom, dan jumlah energi yang tersebar; 3) Cara pembuatan liposom⁷.

2.1.2 Produksi Liposom

Liposom dapat berupa lipid lapis ganda selapis, vesikel unilamellar, atau dapat berupa lapis ganda mulipel, disebut vesikel multilamellar. Vesikel unilamellar lebih sering digunakan karena ukurannya, daya biokompatibilitasnya, dan ruang dalam yang luas^{43,44}.

Pada umumnya, prosedur pembuatan liposom menggunakan dispersi sederhana fosfolipid kering di dalam media air menggunakan *homogenizer*⁴³. Prosedur ini menghasilkan bentuk liposom multilamellar. Bentuk unilamellar bisa dibuat dari multilamellar dengan menggunakan iradiasi ultrasonik atau dengan melewati vesikel multilamellar tersebut ke penyaring di bawah tekanan. Lipid pada larutan organik dapat disuntikkan ke dalam media *aqueous*. Metode ini biasanya menghasilkan vesikel unilamellar^{43,45}.

Metode pembuatan liposom lainnya adalah hidrasi lipid yang diikuti dengan agitasi intensitas tinggi dengan menggunakan sonikasi atau *high-shear propeller*. Pada liposom anionik, metode ini menggabungkan berbagai campuran bahan dari *dipalmitoylphosphatidylcholine* (DPPC) dan *dipalmitoylphosphatidylglycerol* ke dalam bufer garam fosfat. Sedangkan liposom kationik dipreparasi dari DPPC, kolesterol, dan *cationic surfactant dimethyl dioctadecylammonium bromide* (DDAB)⁴³.

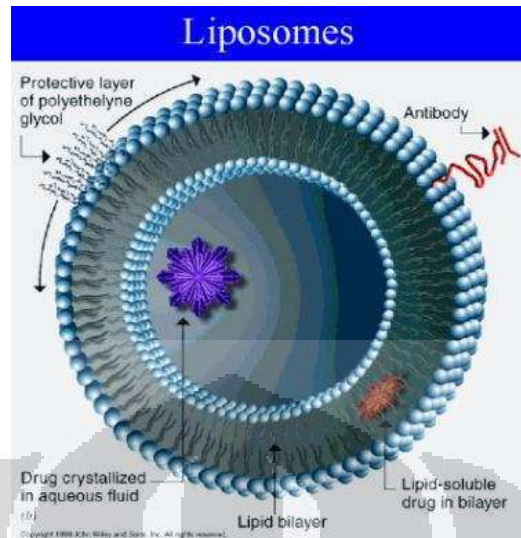
Lipid terpecah dan tercampur di dalam kloroform dan pelarut akan disingkirkan oleh putaran evaporasi pada suhu 60°C untuk mendapatkan lapisan tipis lipid. Bufer garam fosfat ditambahkan dan tabung di agitasi dengan kuat pada putaran *mixer* untuk memproduksi vesikel multilamellar (MLV). MLV selanjutnya di sonikasi pada suhu 60°C selama 15 menit untuk memproduksi liposom unilamellar. Setelah disonikasi, liposom diinkubasi pada suhu 60°C selama 15 menit untuk membuang deterjen dan menjadi lipid yang memiliki konsentrasi misel yang sangat rendah, terendap dan secara termodinamis akan tersusun dengan sendirinya menjadi vesikel unilamellar^{42,43,45}.

2.1.3 Liposom Sebagai Pembawa Obat

Dewasa ini, penggunaan liposom dalam bidang medis sudah sangat luas diantaranya sebagai diagnosis, kemoterapi, imunoterapi, dan terapi gen^{7,34}. Liposom juga telah digunakan sebagai alat pembelajaran untuk mempelajari tranpor transmembran, permeabilitas lipid lapis ganda, fusi membran, dan interaksi protein lipid. Selain itu, liposom juga telah digunakan sebagai suatu pembawa obat, enzim, materi genetik, dan bahan perawatan kulit lainnya^{21,7,28}.

Liposom dimanfaatkan sebagai pembawa obat dengan alasan vesikel ini dapat memberikan keuntungan yakni: liposom dapat mengarahkan obat pada target tertentu, misalnya pada *long-circulating liposomes* yang bekerja pada target selektif area patologis tertentu; liposom dapat sebagai reservoir obat yang melepaskan obat secara perlahan sehingga akan meningkatkan efektivitas obat dan memperpanjang masa edar obat di darah; liposom dapat melindungi obat dari degradasi sebelum mencapai target; liposom melindungi pasien dari efek samping langsung dari obat yang *ter-expose*; liposom dapat melarutkan obat lipofilik yang sulit diberikan secara intravena, sehingga pemberiannya dikemudian hari akan lebih mudah^{42,46}.

Liposom dapat membawa obat dan berbagai jenis molekul diantaranya protein, nukleotida, dan plasmid. Obat / substansi yang akan dibawa bisa melalui berbagai cara, meliputi: terikat dengan membran liposom; terintegrasi di antara dwilapis lipid; terinterkalasi dalam dwilapis lipid; atau terlarut dalam substansi cair di dalam vesikel^{4,47,48}. Berikut merupakan gambaran skematis inkorporasi substansi pada liposom.



Gambar 3: Liposom sebagai pembawa obat²⁶

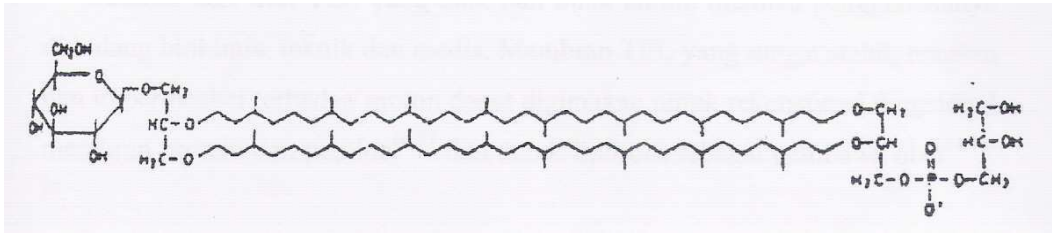
Terdapat beberapa proses pelepasan substansi materi dari liposom. Pertama, melalui fusi sempurna membran lipid liposom dengan membran sel target. Kedua, liposom melepaskan isinya ke ruang interstisial untuk selanjutnya substansi secara aktif diambil oleh sel melalui transpor paraseluler. Cara ini terjadi pada liposom yang sensitif pada perubahan temperatur. Jadi, liposom akan pecah saat terjadi perubahan suhu dan liposom akan melepaskan isinya ke ruang ekstraseluler^{21,23}.

Dalam menjalankan fungsinya sebagai pembawa obat, ukuran dan stabilitas membran lipid liposom perlu diperhatikan. Semakin kecil ukuran liposom, maka semakin lama liposom dapat bertahan dalam sirkulasi darah yang artinya juga akan meningkatkan efektivitas terapi⁴⁹. Sebagai pembawa obat, liposom pun harus memiliki sifat stabil baik fisik, kimia, maupun biologi^{9,50} dan jumlah lapisan lipid yang ada pada setiap liposom. Liposom yang stabil mampu membawa muatannya dengan lebih baik hingga mencapai target. Berbagai penelitian terus dikembangkan guna mendapatkan komposisi liposom yang tepat dan menjadi liposom yang stabil secara fisik, kimia, maupun biologis sehingga dapat digunakan dengan mudah dan aman.

2.2 Tetra Eter Lipid

Tetra eter lipid merupakan sejenis lipid yang merupakan produk ekstraksi membran Archaea bacterium. Tetra ether lipid bisa berasal dari *Thermoplasma acidophilum*, *Sulfolobus*

acidocaldarius, dan archaea yang lainnya^{38,39}. Struktur TEL dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 4: TEL pada *Thermoplasma acidophilum*³⁸

Membran *archaea* tersusun atas fosfolipid yang terdiri atas molekul yang memiliki kekhasan dibanding membran lainnya⁵¹. Pertama, membran *archaea* tersusun atas lipid gliserol-eter bukan lipid gliserol-ester seperti halnya membran eukariot dan bakteri lain. Perbedaan kedua tipe fosfolipid ini terletak pada ikatan yang mengikat lipid dan gliserol. Ikatan ether lebih kuat secara kimia dibandingkan ikatan ester, ikatan eter-gliserol sangat resisten terhadap hidrolisis pada pH rendah sehingga memberi keuntungan dibandingkan dengan ikatan ester. Sifat ini membawa dampak positif karena membantu *archaea* untuk bisa bertahan pada temperatur ekstrim dan lingkungan asam atau basa. Liposom dengan penambahan TEL lebih stabil dibandingkan liposom konvensional atau ester pada suhu tinggi. Hal ini dikarenakan ikatan eter pada TEL^{38,40,51}.

Kedua, ujung lipid pada fosfolipid *archaea* secara kimiawi berbeda dari organisme lain. Lipid *archaea* memiliki rantai samping isoprenoid dan rantai panjang. Hal ini menyebabkan membran *archaea* bisa bertahan dari kebocoran pada temperatur tinggi karena menambah efek fluiditas³⁹. Selain itu, membran fosfolipid *archaea* membentuk lipid lapis tunggal (monolayer). Sifat ini membuat membran mereka menjadi lebih kuat dan bertahan lebih baik di lingkungan yang keras karena dapat meningkatkan resistensi terhadap oksidasi^{39,40,52}.

Dengan kelebihan-kelebihan diatas, penambahan derivat TEL pada formulasi liposom dapat meminimalisasi masalah ketidakstabilan fisik pada liposom konvensional seperti hidrolisis dan degradasi oksidatif⁵³.

Thermoplasma acidophilum merupakan archaea bakterium termoasidofilik yang menjadi salah satu sumber utama TEL yang pertama kali diisolasi oleh Darland et al³⁹ pada tahun 1970. *T. acidophilum* tumbuh optimum pada lingkungan dengan pH 1 sampai 2 dan

suhu 59°C. *T. acidophilum* merupakan organisme obligat aerob. Akan tetapi, organisme ini hanya membutuhkan sedikit O₂.

T. acidophilum memiliki membran sel yang memiliki keistimewaan yakni merupakan satu lapis fosfolipid yang terdiri dari *polyisoprenoid lipid*. Pada kedua ujung rantai isoprenoid terdapat ikatan eter yang stabil dalam asam ke gliserol. Struktur ini memungkinkan *Thermoplasma* hidup dalam lingkungan yang ekstrim. Selain itu, *Thermoplasma* ini tidak memiliki dinding sel, meskipun demikian, *T. acidophilum* sangat resisten terhadap pH asam⁷.

Sumber lain dari TEL adalah *Sulfolobus acidocaldarius*. Normalnya spesies ini tumbuh pada suhu yang panas, yakni antara 65-80°C dan pada pH 2-3. Membran plasma *S. acidocaldarius* terdiri atas tetraeter lipid bipolar yang disusun oleh fraksi E lipid polar (PLFE). Fraksi E lipid polar mengandung campuran tetraeter lipid dengan struktur tetraeter dialkylnonitol gliserol (*Glycerol Dialkylnonitol Tetraether*, GDNT) atau tetraeter dialkylgliserol gliserol (*Glycerol Dialkylglycerol Tetraether*, GDGT)⁵⁴.

TEL hasil ekstraksi dari *Thermoplasma acidophilum* merupakan tetraeter lipid yang sangat stabil dari segi struktur fisik maupun kimiawi^{52,55,56}. Berdasarkan penelitian terbaru oleh Patel et al¹¹ pada liposom yang terbuat dari membran Archae *Methanosarcina mazei*, *Methanobacterium espanolae* dan *Thermoplasma acidophilum* menunjukkan bahwa vesikel multilamellar dari *T. acidophilum* paling stabil secara *in vitro* di antara ketiga jenis Archae tersebut.

Berdasarkan penelitian Purwaningsih¹², penggunaan TEL selain sebagai stabilisator membran liposom, dapat juga meningkatkan inkorporasi obat. Hal ini dibuktikan dengan penggunaan TEL dapat meningkatkan inkorporasi MPLP (metil prednisolon palmitat) sampai sebesar 95% dibandingkan liposom tanpa TEL, dan tetap stabil dalam hal ukuran partikel liposom pada penyimpanan selama 9 hari pada suhu 20°C.

2.3 Image Pro Express 4.5

Liposom atau gelembung lemak merupakan partikel koloid yang terdiri dari fosfolipid bilayer. Karena bentuknya yang berupa koloid maka diameternya pun bisa berbeda-beda⁷.

Terdapat beberapa tehnik yang digunakan untuk mengukur ukuran liposom. Yang paling akurat diantaranya adalah menggunakan *particle sizer* atau *image pro express*. Dengan

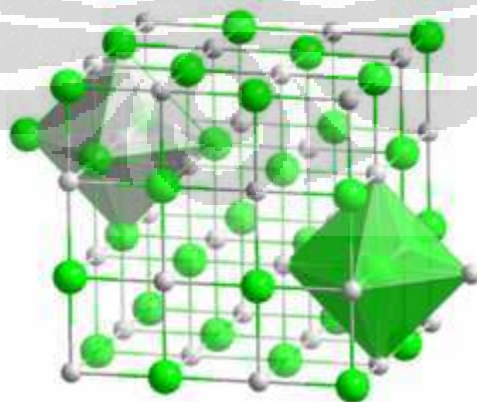
menggunakan *particle sizer* dapat diketahui pula diameter rata-rata serta distribusi dari liposom. Pengukuran dengan menggunakan metode tersebut adalah secara kuantitatif. Selain itu, ukuran liposom juga bisa diukur dengan menggunakan mikroskop elektron secara kualitatif sehingga hasil pengukurannya tidak begitu sensitif^{18,19}.

Image pro express 4.5 merupakan perangkat lunak yang menghadirkan kemudahan untuk mendapatkan proses dan analisis gambar dari sebuah objek sehingga bisa mengukur ukuran suatu partikel (misalnya liposom) secara cepat, detail dan akurat. *Image pro express 4.5* dilengkapi dengan kemampuan mengintegrasikan teks, data, dan grafik dalam satu paket sehingga memudahkan pengerjaan penghitungan ukuran liposom secara akurat. *Image pro express 4.5* dapat memproses gambar dengan cepat²⁰.

2.4 Natrium Klorida (NaCl)

Natrium klorida merupakan senyawa ionik sederhana yang terdiri dari susunan raksasa ion natrium dan klorida. Natrium klorida disebut juga garam dapur atau *halite*. Natrium klorida merupakan garam paling bertanggung jawab dalam keseimbangan cairan ekstraseluler pada organisme multiseluler. Natrium juga merupakan faktor penting dalam potensial membran sel dan transport aktif molekul melalui membran sel. Satu gram natrium klorida mengandung 0,3933 natrium dan 0,6067 g klorin⁵⁷⁻⁶⁹.

Ion natrium sangat penting peranannya dalam mengatur volume darah, fungsi membran dan absorpsi air. Peran ion klorin pun serupa dengan ion natrium yakni fungsi membran, volume darah, dan absorpsi cairan⁵⁸.



Gambar 5. Struktur kristal natrium klorida⁵⁷

Putih: ion natrium; hijau: ion klorida

Kristal garam natrium klorida dibentuk dengan struktur geometri oktahedral. Seperti ditunjukkan oleh gambar diatas, setiap ion klorida (hijau) dikelilingi oleh 6 ion natrium (putih), begitu pula sebaliknya. Struktur dasar ini dikenal dengan nama struktur *halite*^{57,59}.

Natrium dan klorida bergabung dengan menggunakan ikatan ionik dan kekuatan elektrostatik. Dengan ikatan ionik ini, maka natrium klorida mudah larut dalam air. Natrium klorida merupakan larutan netral karena ionisasinya tidak mempengaruhi konsentrasi lokal dari ion hidrogen atau ion hidroksida^{57,58}.

2.5 Kalsium Klorida (CaCl₂)

Kalsium klorida merupakan senyawa ionik gabungan dari ion kalsium dan ion klorida. Dalam suhu ruang, senyawa ini berbentuk garam padat namun sangat larut dalam air⁶⁰. Kalsium klorida memiliki beberapa sifat yang penting, yakni bersifat higroskopik sehingga dapat menyerap air, kalsium klorida juga bersifat eksotermik atau melepaskan panas ketika meleleh. Selain itu, senyawa ini akan larut saat menyerap air dari kelembaban udara. Sifat lainnya adalah kalsium klorida dapat meleleh pada suhu yang jauh lebih rendah daripada garam. Di dalam tubuh, kalsium (Ca²⁺) bersama dengan Natrium (Na⁺) berperan dalam transmisi saraf, pengaturan enzim, dan kontraksi otot^{58,61}.

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan mengukur dan membandingkan hasil distribusi diameter liposom EPC-TEL 2.5 hasil sonikasi yang terpapar CaCl_2 dan NaCl 150 mOsmol pada pH 7, suhu 4°C . Pengukuran dilakukan pada hasil data hari ke-1 dan hari ke-90 dengan program *Image Pro Express 4.5*

3.2. Tempat dan waktu

Penelitian ini dilakukan di Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran dan Departemen Fisika Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada bulan Juli – Oktober 2008.

3.3. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah hasil dokumentasi yang berupa gambar digital dari liposom EPC-TEL 2.5 dengan penambahan CaCl_2 dan NaCl 150 mOsmol pada pH 7. Dokumentasi ini merupakan hasil penelitian Venessa¹³, yang dilakukan pada bulan April – Juli 2007.

Sampel diambil dari hasil dokumentasi liposom EPC-TEL 2.5 dengan penambahan CaCl_2 dan NaCl pada 150 mOsmol pada pH 7 pada hari ke-1 dan hari ke-90, pada masing-masing perlakuan.

3.4. Besar sampel

Sampel diambil dari hasil dokumentasi perlakuan dalam penelitian kelompok pendahuluan. Pada penelitian ini, perlakuan yang digunakan adalah Liposom EPC-TEL 2.5 dengan penambahan CaCl_2 150 mOsmol pada pH 7 pada hari ke-1, Liposom EPC-TEL 2.5 dengan penambahan CaCl_2 150 mOsmol pada pH 7 pada hari ke-90, Liposom EPC-TEL 2.5 dengan penambahan NaCl 150 mOsmol pada pH 7 pada hari ke-1, dan Liposom EPC-TEL 2.5 dengan penambahan NaCl 150 mOsmol pada pH 7 pada hari ke-90.

Besar sampel akan ditentukan dengan rumus Federer, dimana terdapat 6 kelompok perlakuan [jenis garam (NaCl dan CaCl₂) dan waktu (hari ke-1 dan hari ke-90)]

$$(n-1)(t-1)$$

$$t = \text{jumlah kelompok perlakuan} = 4$$

$$(n-1)(4-1) \geq 15$$

$$(n-1) 3 \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Dari perhitungan diatas didapatkan besar sampel minimal yang digunakan adalah 6 untuk setiap kelompok perlakuan

3.5. Cara pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan metode *random sampling* data dari penelitian sebelumnya¹³ dan data yang diperoleh memiliki sebaran homogen.

Dari hasil uji pre-eliminasi pada pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2.5 dengan perlakuan NaCl 150 mOsmol pada pH 7 dan CaCl₂ 150 mOsmol pada pH 7, masing-masing ditentukan 6 buah gambar digital dari 10 gambar hasil penelitian pendahuluan¹³. Dari masing-masing foto ditentukan jumlah liposom kecil dan liposom besar untuk dianalisis distribusinya. Pada data liposom kecil, didapatkan hasil analisis distribusi data adalah normal. Keadaan ini menyatakan bahwa pada data dengan distribusi normal dengan hasil uji kemaknaan Shapiro-Wilk $p > 0.05$, maka sampel yang dihitung dapat mewakili populasi yang diteliti⁶².

Pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana menggunakan teknik pengundian pada masing-masing perlakuan yang akan diteliti. Pengambilan ini dilakukan dengan memberi nomor pada masing-masing unit populasi, dan secara acak mengambil nomor-nomor yang akan dijadikan sampel sesuai dengan perhitungan jumlah sampel yang dilakukan.

Hasil dokumentasi yang diambil tersebut kemudian ditentukan secara acak liposom yang berukuran kurang dari 100 nm sebanyak 10 buah dan seluruh liposom yang berukuran lebih dari 100 nm berdasarkan pengukuran dengan skala Olympus yang dilakukan pada penelitian Venessa¹³.

Dari masing-masing gambar liposom yang didapat, dengan bantuan program *Image Pro Express 4.5* diameter akan diukur dua kali dalam sisi liposom yang berbeda, kemudian diambil nilai rata-rata. Kemudian data tersebut akan diolah secara deskriptif analitik.

3.6. Alat dan bahan

Alat yang digunakan:

1. Satu set komputer
2. Program *Image pro express*

Bahan yang digunakan antara lain:

Hasil dokumentasi berupa foto liposom EPC-TEL hasil sonikasi dengan penambahan CaCl_2 dan NaCl 150 mOsmol pada pH 7. Hasil dokumentasi ini diambil dengan kamera Sony CCD-IRIS *color video camera* di laboratorium Fisika FKUI, pada bulan April-Juli 2007.

3.7. Cara Kerja

Langkah-langkah pengukuran diameter liposom menggunakan program *Image Pro Express 4.5* adalah sebagai berikut:

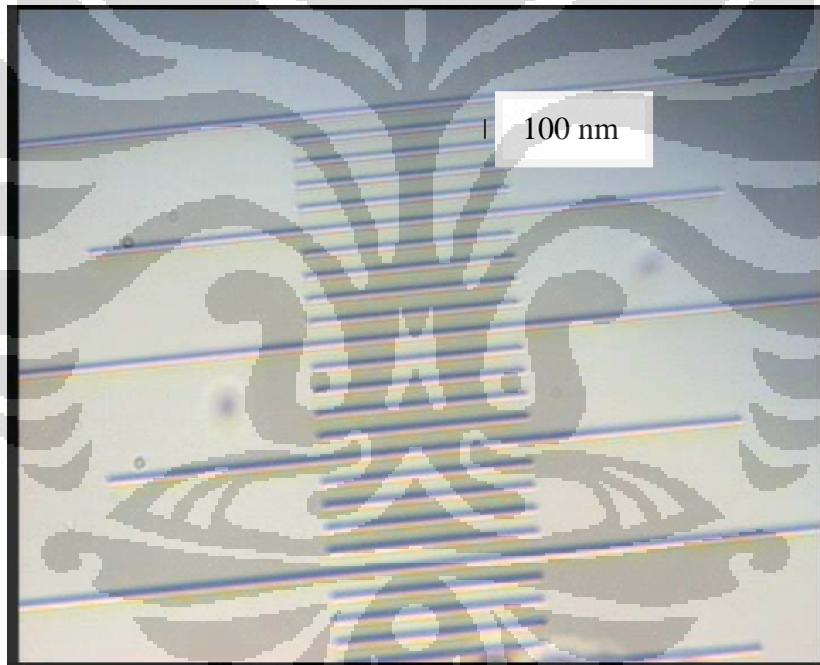
1. Mengambil foto Skala ukur *Olympus* 100 nm dengan perbesaran 400x
2. Membuka hasil foto skala ukur *Olympus* tersebut di program *Image Pro Express 4.5* (Gambar 6)
3. Gambar liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 dan NaCl 150 mOsmol pH 7 pada hari ke-1 dan ke-90 diukur diameternya dengan cara yang sama seperti pengukuran skala ukur *Olympus* 100 nm. Namun, dilakukan dua kali pengukuran diameter liposom dengan arah yang berbeda (lihat Gambar 7). Data yang diukur adalah data yang diambil dari 6 buah sampel (6 foto dengan 6 lapang pandang berbeda) dari setiap perlakuan. Dari setiap foto, dihitung jumlah liposom kecil (10 buah) dan semua liposom besar yang ada dalam foto.

4. Pada saat pengukuran diameter, pada kotak *line profile*, X0 harus disesuaikan menjadi nol dan X2 merupakan sisi yang berlawanan jika ditarik garis. Sehingga jarak dari X0 – X2 merupakan diameter liposom yang diukur dalam *pixel*.
5. Setelah itu, dua hasil pengukuran diameter liposom (dalam *pixel*) yang telah didapatkan dihitung dengan rumus:

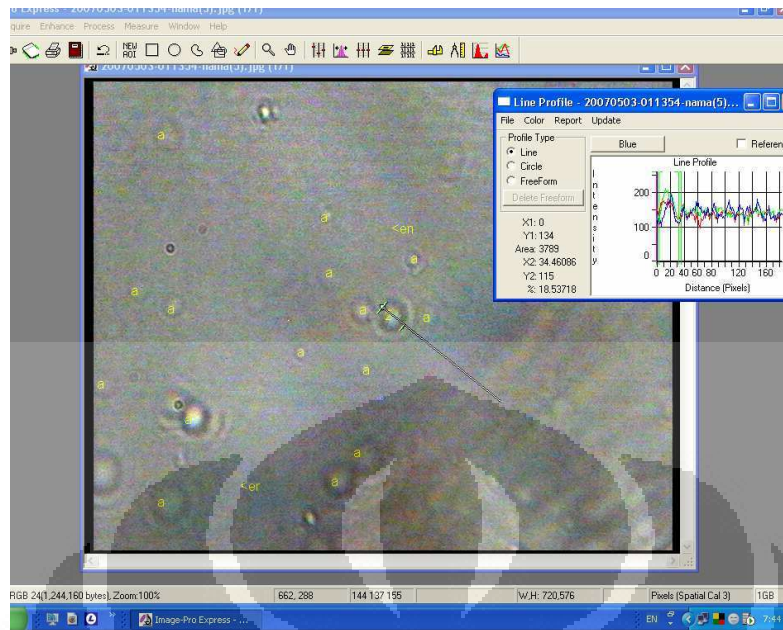
$$\text{Diameter Liposom (nm)} = X3 / \text{ukuran skala Olympus (pixel)} \times 100 \text{ nm}$$

Keterangan:

X3 = Hasil nilai piksel rata-rata dari dua kali pengukuran diameter liposom dengan menggunakan *Image Pro Express 4.5*.



Gambar 6: Skala ukur *Olympus* skala 100 nm dengan perbesaran 400 X



Gambar 7: Cara pengukuran diameter Liposom EPC-TEL 2.5 dengan program *Image Pro Express 4.5*

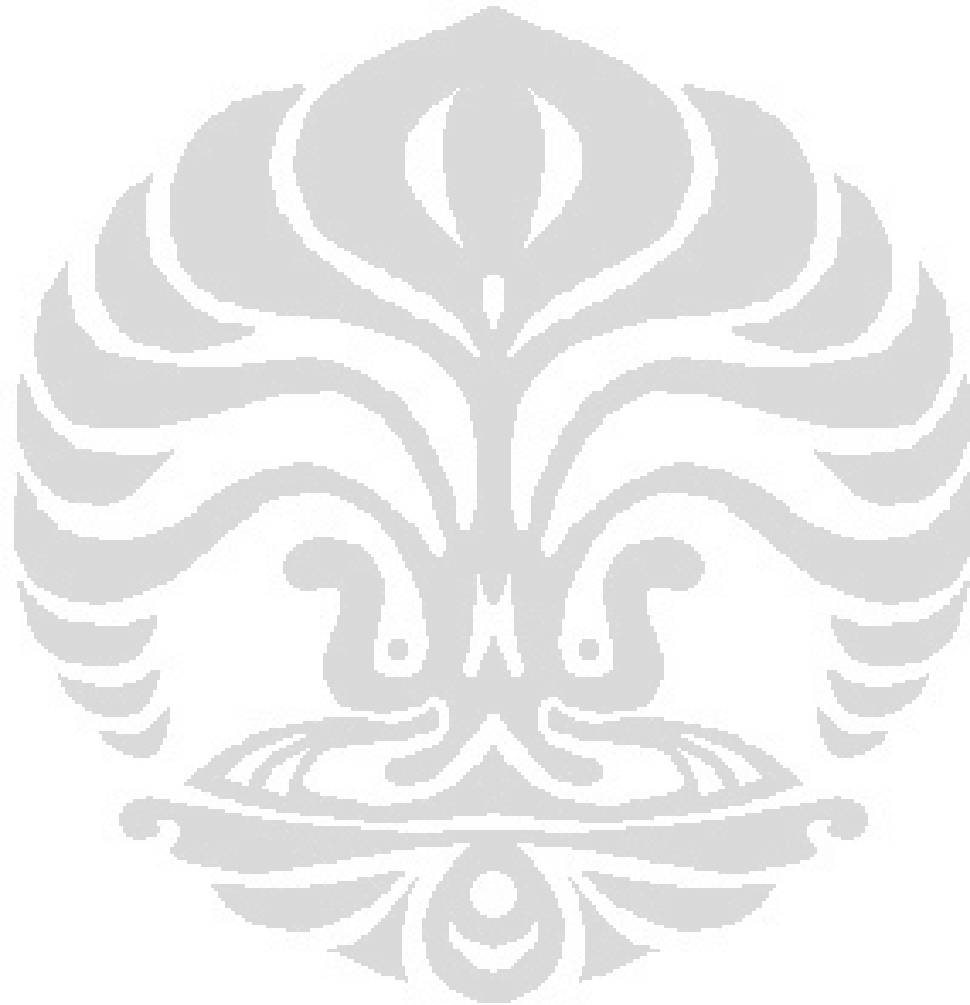
3.8. Analisis data

Data hasil perhitungan diameter liposom (dalam nm) merupakan data kuantitatif dan berjumlah dua kelompok (waktu dan jenis garam). Pada perbandingan diameter liposom dalam kelompok (perbandingan antara diameter liposom hari ke-1 dengan hari ke-90 pada pemaparan NaCl atau CaCl₂ 150 mOsmol pH 7), memiliki variabel yang saling berhubungan. Sedangkan, pada perbandingan diameter liposom antar kelompok (perbandingan diameter liposom pemaparan NaCl 150 mOsmol pH 7 hari ke-90 dengan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 hari ke-90) memiliki variabel yang tidak saling berhubungan. Analisis statistik terhadap data kuantitatif yang didapatkan menggunakan uji statistik parametrik. Hal yang dianalisa pertama kali adalah uji distribusi normal sampel. Dalam pengujian ini digunakan uji kemaknaan *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel ≤ 50 .

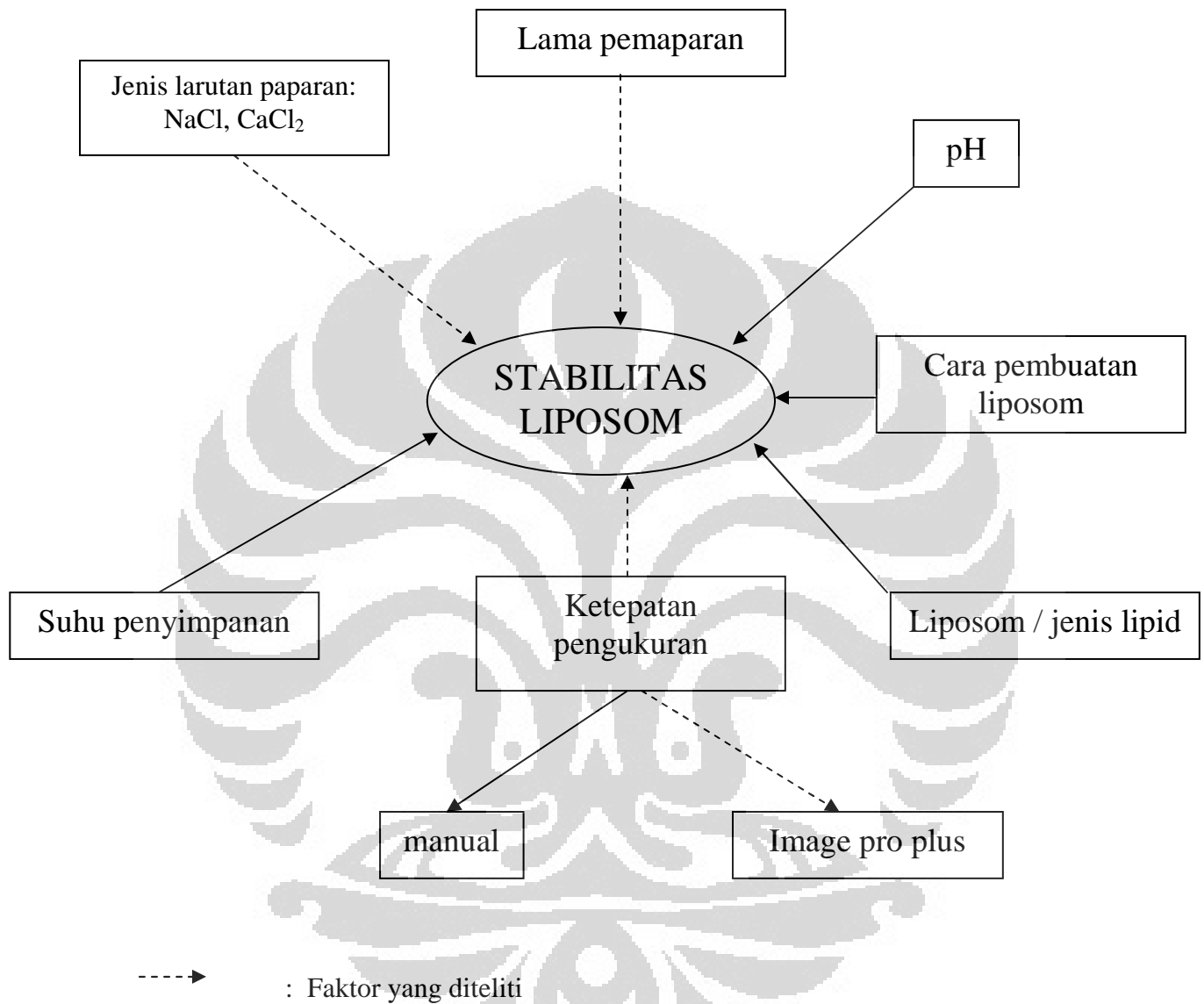
Pada perbandingan dalam kelompok (diameter liposom paparan NaCl 150 mOsmol pH 7 hari ke-1 dengan hari ke-90; diameter liposom paparan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 hari ke-1 dengan hari ke-90), liposom kecil memiliki sebaran data normal, maka digunakan uji t berpasangan dengan batas kemaknaan $p=0,05$. Sedangkan, pada liposom besar sebaran data

tidak normal, sehingga digunakan uji nonparametrik Wilcoxon dengan batas kemaknaan $p=0,05$.⁶³

Pada perbandingan antar kelompok (diameter liposom paparan NaCl 150 mOsmol pH 7 hari ke-90 dengan diameter liposom paparan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 hari ke-90), liposom kecil dan besar memiliki sebaran data normal, maka digunakan uji t tidak berpasangan dengan batas kemaknaan $p=0,05$ ⁶³. Data diolah dengan program SPSS 16.0.



3.9. Kerangka konsep



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Diameter liposom dalam nanometer (nm) EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 dan NaCl 150 mOsmol pH 7 pada hari ke-1 dan ke-90 diukur dengan cara membandingkan rata-rata pengukuran diameter piksel liposom dengan rata-rata skala *Olympus* 100 nm (*pixel*) dan dikalikan dengan 100 nm (Tabel 3). Diameter rata-rata liposom diukur dengan mengukur diameter liposom dengan posisi diameter yang berbeda.

Hasil perhitungan diameter rata-rata liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan NaCl 150 mOsmol pH 7 dan CaCl_2 pada hari ke-1 dan hari ke-90 dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5* dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2. Hasil perhitungan diameter yang tercantum pada Tabel 1 dan 2 tersebut merupakan nilai rata-rata yang diperoleh dari setiap foto.

Tabel 1. Rata-rata hasil pengukuran liposom kecil dengan program *Image Pro Express 4.5* dengan perbesaran 400X.

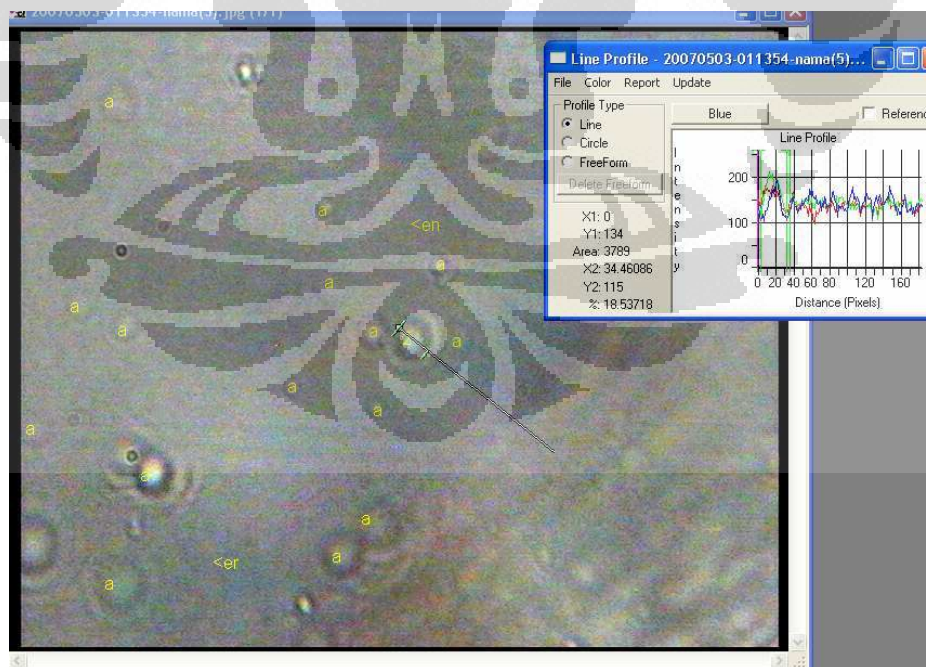
	Hari-1		Hari-90	
	NaCl	CaCl_2	NaCl	CaCl_2
Foto ke-1	69,61	72,82	78,73	55,56
Foto ke-2	60,00	70,39	77,06	80,59
Foto ke-3	61,66	69,85	86,57	61,02
Foto ke-4	67,80	72,15	81,17	72,64
Foto ke-5	83,16	74,97	76,82	71,59
Rata-rata	64,77	71,30	80,88	67,45
SD	9,16	2,04	4,03	11,29

Tabel 2. Rata-rata hasil pengukuran liposom besar dengan program *Image Pro Express 4.5* dengan perbesaran 400X.

	Hari-1		Hari-90	
	NaCl	CaCl ₂	NaCl	CaCl ₂
Foto ke-1	0	115,66	114,37	113,56
Foto ke-2	0	106,37	127,35	122,77
Foto ke-3	0	128,20	118,98	129,62
Foto ke-4	0	110,66	135,98	121,87
Foto ke-5	0	117,84	130,06	132,58
Rata-rata	0	115,75	125,35	124,08
SD	0	8,27	8,66	23,23

Tidak ditemukannya liposom besar pada pengukuran diameter liposom dengan paparan NaCl pada hari pertama karena sampel diambil dengan tehnik secara acak dan foto yang terambil dan digunakan sebagai sampel hanya memiliki liposom yang berukuran ≤ 100 nm.

Standar pengukuran diameter liposom dalam penelitian ini menggunakan hasil pengukuran skala *Olympus* 100 nm bisa dilihat di Gambar 1 dan Tabel 3.



Gambar 8: Garis pengukuran diameter liposom dengan perbesaran 400 X menggunakan program *Image Pro Express 4.5*

Tabel 3. Hasil Pengukuran Skala *Olympus* dengan Menggunakan Program *Image Pro Express 4.5* (berdasarkan Gambar.6)

Skala <i>Olympus</i> 100 nm	Pengukuran (<i>pixel</i>)			Standar Skala <i>Olympus</i> yang Dipakai
	1	2	rata-rata	
Pembesaran 400x	47,6	46,4	47	47 <i>pixel</i> /100nm

4.2 Pembahasan

Pada perbandingan dalam kelompok (diameter liposom paparan NaCl hari ke-1 dengan hari ke-90), liposom kecil memiliki sebaran data normal, maka digunakan uji t berpasangan dengan batas kemaknaan $p=0,05$. Sedangkan, pada liposom besar hasil paparan NaCl memiliki sebaran data tidak normal, sehingga digunakan uji non parametrik Wilcoxon dengan batas kemaknaan $p=0,05$ ⁶³. Sedangkan liposom besar dengan pemaparan CaCl₂ memiliki sebaran data normal, sehingga digunakan uji parametrik t berpasangan. Dari hasil analisis SPSS 16.0 didapatkan hasil:

- Perbandingan antara liposom paparan NaCl hari ke-1 dengan hari ke-90 pada liposom kecil yang diuji dengan uji parametrik t berpasangan didapatkan $p=0,089$. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara diameter liposom yang berukuran ≤ 100 nm pada hari ke-1 dengan hari ke-90.
- Liposom besar dari liposom hasil pemaparan NaCl 150 mOsmol pH 7 memiliki sebaran data tidak normal sehingga dilakukan transformasi data sebagai usaha menormalkan sebaran data. Namun, setelah dilakukan transformasi data, sebaran data tetap tidak normal sehingga data diuji dengan uji non parametrik Wilcoxon. Dari hasil uji non parametrik wilcoxon didapatkan $p=0,068$ ($p>0,05$). Data statistik tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara diameter liposom yang berukuran >100 nm pada hari ke-1 dengan hari ke-90.
- Berdasarkan kedua data statistik di atas, bisa disimpulkan bahwa diameter liposom EPC-TEL 2,5 dalam paparan NaCl selama 90 hari tidak memiliki perbedaan bermakna.
- Perbandingan antara liposom paparan CaCl₂ hari ke-1 dengan hari ke-90 pada liposom kecil yang diuji dengan uji parametrik t berpasangan karena memiliki sebaran data normal. Dari hasil uji t berpasangan didapatkan $p=0,459$ ($p>0,05$). Hal

ini menunjukkan bahwa diameter liposom EPC-TEL 2,5 yang berukuran ≤ 100 nm dalam paparan CaCl_2 selama 90 hari tidak memiliki perbedaan bermakna karena $p > 0,05$.

- Liposom besar dari hasil pemaparan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 memiliki sebaran data normal, maka digunakan uji t berpasangan. Berdasarkan uji tersebut, didapatkan $p = 0,087$ ($p > 0,05$). Data statistik tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara diameter liposom yang berukuran > 100 nm pada hari ke-1 dengan hari ke-90.
- Berdasarkan kedua data statistik di atas, bisa disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara diameter liposom EPC-TEL 2,5 dalam paparan CaCl_2 pada hari ke-1 dengan hari ke-90.

Pada perbandingan antar kelompok (diameter liposom paparan NaCl 150 mOsmol pH 7 hari ke-90 dengan diameter liposom paparan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 hari ke-90), liposom kecil dan besar memiliki sebaran data normal, maka digunakan uji t tidak berpasangan dengan batas kemaknaan $p = 0,05^{63}$. Berdasarkan uji parametrik t tidak berpasangan didapatkan:

- Pada liposom diameter kecil diperoleh nilai $p = 0,076$ ($p > 0,05$). Data statistik tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan nilai ukur diameter yang bermakna antara liposom EPC-TEL 2,5 paparan NaCl 150 mOsmol pada pH 7 dibandingkan dengan liposom EPC-TEL 2,5 paparan CaCl_2 150 mOsmol pada pH 7 pada hari ke-90 dengan suhu 4°C .
- Analisis statistik diameter liposom besar dalam larutan NaCl dan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 hari ke-90 diperoleh nilai $p = 0,810$ ($p > 0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan nilai ukur diameter yang bermakna antara liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi paparan NaCl 150 mOsmol pada pH 7 dibandingkan dengan liposom EPC-TEL 2,5 paparan CaCl_2 150 mOsmol pada pH 7 di hari ke-90 pada suhu 4°C .
- Berdasarkan kedua data statistik di atas, bisa disimpulkan bahwa pada perbandingan antar kelompok, diameter liposom EPC-TEL 2,5 dalam paparan NaCl selama 90 hari tidak memiliki perbedaan diameter yang bermakna.

Menurut perhitungan jumlah sampel dengan rumus Federer, sampel yang seharusnya digunakan minimal berjumlah 6 foto. Namun, dikarenakan kesalahan saat penghitungan variabel pada awal penelitian maka sampel yang digunakan hanya lima buah. Dari hasil analisis statistik dengan menggunakan 5 buah sampel semua menghasilkan nilai yang tidak berbeda bermakna. Sehingga bisa ditarik kesimpulan, bahwa dengan menggunakan 6 buah sampel, maka akan menghasilkan analisis statistik yang tidak berbeda bermakna pula.

Diameter liposom merupakan salah satu parameter kestabilan dari liposom. Dengan menggunakan program *Image pro express 4.5*, peneliti bisa mengukur dengan akurat diameter liposom dan melihat apakah setelah terpapar larutan garam dalam waktu 90 hari masih tetap stabil. Parameter kestabilan liposom adalah ukurannya yang tetap ≤ 100 nm.

Dalam aplikasinya, liposom yang digunakan adalah liposom yang berukuran 80-200 nm⁵. Ukuran liposom yang kecil dapat meningkatkan efektivitas terapi karena durasinya yang memanjang dalam sirkulasi darah. Untuk mendapatkan ukuran yang demikian dapat dilakukan beberapa metode, diantaranya adalah sonikasi dengan menggunakan *bath sonicator*³⁴.

Pada penelitian acuan¹³, bahan liposom yang digunakan adalah liposom konvensional EPC yang telah ditambahkan tetraeter lipid (TEL) 2,5 mol % menjadi liposom EPC-TEL 2,5. Liposom hasil kombinasi ini terbukti lebih stabil dan menutupi kekurangan liposom konvensional¹².

Penambahan TEL dalam komposisi liposom konvensional sebagai penstabil liposom dikarenakan struktur TEL yang memiliki 2 gugus polar dengan tebal membran sekitar 4 nm, sehingga diharapkan dapat berinkorporasi dengan membran liposom EPC seperti pasak¹². Penambahan TEL juga dapat menambah muatan negatif pada permukaan liposom, sehingga liposom lebih stabil³⁹.

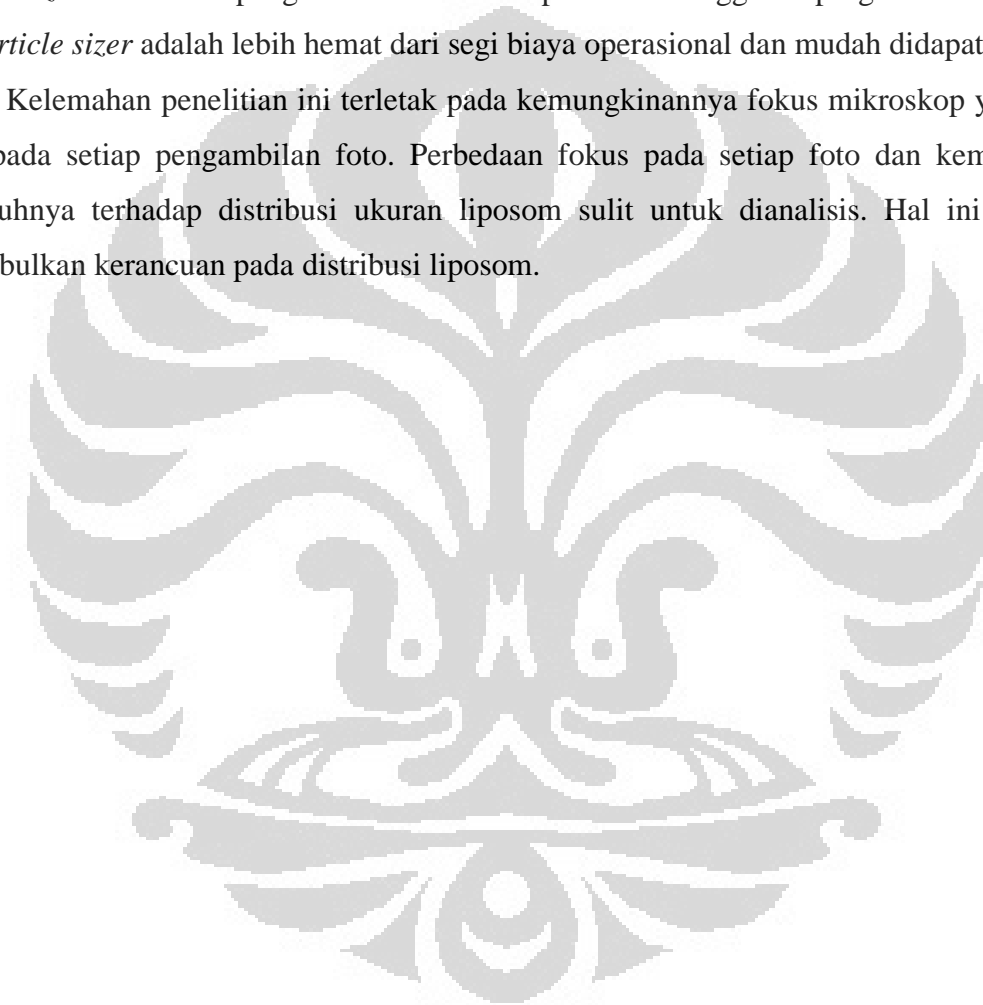
Uji stabilitas liposom yang digabungkan dengan TEL yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum* menunjukkan, bahwa TEL cukup stabil pada pH asam dibandingkan pada pH netral ataupun alkalis. Uji stabilitas liposom TEL diukur berdasarkan ukuran partikel dengan menggunakan *particle sizer* dan penglepasan karboksifluoresens dari membran liposom⁶⁴.

Pada penelitian acuan¹³, larutan garam yang digunakan adalah NaCl 150 mOsm pH 7 dan CaCl₂ 150 mOsm pH 7. Dalam kedua larutan tersebut terbukti tidak mengalami

destabilisasi yang signifikan berdasarkan parameter kestabilan yang digunakan, yakni ukuran diameter liposom. Diameter liposom diukur dengan menggunakan program *image pro express 4.5*, sehingga pengambilan data bisa lebih akurat dibandingkan dengan pengukuran manual. Dengan menggunakan data numerik hasil pengukuran, data bisa dianalisis dengan menggunakan uji parametrik. Dengan demikian, hasil yang diperoleh sensitif.

Program *image pro express 4.5* memiliki keakuratan yang hampir sama dengan alat *particle sizer* dalam hal pengukuran diameter liposom. Keunggulan program ini dibanding alat *particle sizer* adalah lebih hemat dari segi biaya operasional dan mudah didapat.

Kelemahan penelitian ini terletak pada kemungkinannya fokus mikroskop yang tidak sama pada setiap pengambilan foto. Perbedaan fokus pada setiap foto dan kemungkinan pengaruhnya terhadap distribusi ukuran liposom sulit untuk dianalisis. Hal ini mungkin menimbulkan kerancuan pada distribusi liposom.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Program *Image Pro Express 4.5* dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk mengukur diameter liposom secara lebih sensitif, cepat, dan akurat bila dibandingkan dengan tehnik pengukuran secara manual yaitu dengan membandingkan foto liposom dengan skala *Olympus*.
2. Nilai ukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan pemaparan garam kalsium klorida (CaCl_2) 150 mOsmol pada pH 7 dan garam natrium klorida (NaCl) 150 mOsmol pada pH 7 selama penyimpanan 90 hari pada suhu 4°C dapat diukur secara kuantitatif dengan program *Image Pro Express 4.5*.
3. Tidak terdapat perbedaan nilai ukur diameter yang bermakna antara liposom EPC-TEL 2,5 paparan NaCl 150 mOsmol pH 7 hari ke-1 dengan diameter liposom EPC-TEL 2,5 paparan NaCl 150 mOsmol pH 7 hari ke-90. Nilai $p=0,089$ untuk liposom kecil ($d \leq 100$ nm) dan $p=0,068$ untuk liposom besar ($d > 100$ nm).
4. Tidak terdapat perbedaan nilai ukur diameter yang bermakna antara liposom EPC-TEL 2,5 paparan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 hari ke-1 dengan diameter liposom EPC-TEL 2,5 paparan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 hari ke-90. Nilai $p=0,459$ untuk liposom kecil ($d \leq 100$ nm) dan $p=0,087$ untuk liposom besar ($d > 100$ nm).
5. Tidak terdapat perbedaan nilai ukur yang bermakna antara diameter liposom EPC-TEL 2,5 yang dipaparkan NaCl 150 mOsmol pH 7 hari ke-90 dengan liposom EPC-TEL 2,5 yang dipaparkan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 pada hari ke-90. Nilai $p=0,459$ untuk liposom kecil ($d \leq 100$ nm) dan $p=0,810$ untuk liposom besar ($d > 100$ nm).

5.2 Saran

- Program *Image Pro Express 4.5* dapat dijadikan sebagai metode pengukuran diameter liposom secara kuantitatif yang dapat menghasilkan data pengukuran yang lebih akurat dan cepat sehingga sangat menunjang dalam penelitian mengenai uji stabilitas liposom secara kimia, fisika, maupun biologi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chabner BA, Amrein PC, Draker B, Michaelson MD, Calabresi P . Antineoplastic agents. In: Goodman and Gilman (eds). The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. McGraw-Hill Companies. 2006: 1315-89.
2. Krensky AM, Vincenti F, Bennett WM. Drugs used for immunosuppression: Immunosuppressive gents. In: Goodman and Gilman (eds). The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. McGraw-Hill Companies. 2006: 1405-28.
3. Schimmer BP, Parker KL. Adrenocorticotrophic hormone, adrenocortical steroids and their synthetic analog: Inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormone. In: Goodman and Gilman (eds). The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. McGraw-Hill Companies. 2006: 1587-1612.
4. Lasic DD. Liposome as a drug delivery system. In: Lasic DD (ed). Liposome from physics to application. Elsevier Science Publisher BV. 1993: 265-324.
5. Lasic DD. Liposomes. Science and Medicine. In: Lasic DD (ed). Liposome from physics to application. Elsevier Science Publisher BV. Edition 1996 (May-June): 34-43.
6. Kronberg B, Dahlman A, Carlfors J, Karlsson J, Artursson P. Preparation and evaluation of sterically stabilized liposomes: colloidal stability, serum stability, macrophage uptake, and toxicity. *J Pharm Sci* 1990;79(8):667-71.
7. Jufri M. Arah dan perkembangan liposom: drugs delivery systems. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2004; I(2): 59-68.
8. Papahadjopoulos D. Steric stabilization. In: Andrew S.Janoff (ed). Liposomes: Rational Design. *Infoma Health Care*. 1998: 1-12.
9. Lasic DD. Chemistry of lipids and liposomes. In: Lasic DD (ed). Liposomes from Physics to Application. Elsevier Science Publisher BV. 1993: 1-42
10. Perrie Y, Gregory G. Liposomal DNA vaccines: structural characteristics. In: Gregory G and Brenda McC (eds). *Targeting of Drugs: Strategies for Gene*. IOS Press. 2000:102-11.
11. Patel GB, Agnew BJ, Deschatelets L, Fleming LP, Sprott GD. In vitro assessment of archeosome stability for developing oral delivery systems. *Int J of Pharm* 2000;194:39-49

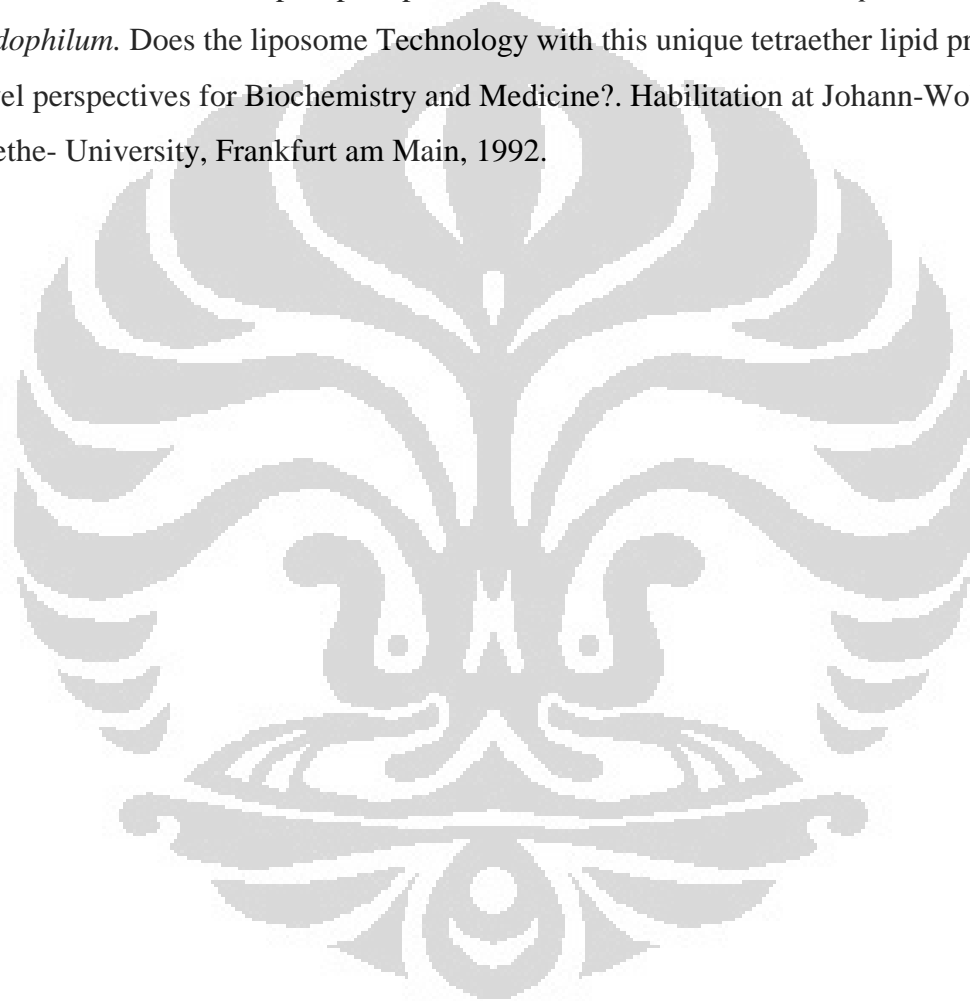
12. Purwaningsih EH, Freisleben HJ, Sadikin M. Peningkatan inkorporasi metilprednisolon palmitat pada liposom yang mengandung tetraetil lipid dari membran *Sulfolobus acidocaldarius* membentuk sediaan baru liposomal metilprednisolon palmitat. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 2002; 1(1): 24-30.
13. Venessa. Uji stabilitas liposom formulasi baru EPC-TEL 2,5 dalam larutan MgCl₂ 150 mOsmol pH 7 selama 90 hari. *Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia* 2007
14. Bosworth ME, Hunt CA. Liposome disposition In Vivo II: Dose Dependency. *J Pharmac Sci* 1982;71(1):100-4
15. Tesoriere, Bongiorno A, Pintaudi AM, D'Anna R, D'Arpa D, Livrea MA. Synergistic interaction between vitamin A and vitamin E against lipid peroxydation in phosphatidilcoline liposomes. *Arch Biochem Biophys* 1996;326(1):57-63.
16. Marliana N. Efek liposom metilprednisolon palmitat terhadap proliferasi limfosit CD4+ dan CD8+ yang distimulasi oleh *Concanavalin A* secara *in vitro*. Tesis Program Studi Ilmu Biomedik FKUI, Program Pascasarjana UI, Januari 2004.
17. Wrigglesworth JM, Wooster MS, Elsdon J, Danneel HJ. Dynamics of proteoliposome formation, intermediate states during detergent dialysis. *Biochem J* 1987;246:737-44.
18. Anonymous. Determine the size of Liposome. Available at: www.avantilipids.com/displayFAQ.asp?Q=5. [Diakses pada tanggal: 25 Juli 2008].
19. Anonymous. Particle sizer analysis. Available at: http://www.nalresearch.com/NetRef_ParticleSizer.html. [Diakses pada tanggal: 25 Juli 2008].
20. Anonymous. Image Pro Express. Available at: <http://www.mediacy.com/index.aspx?page=1pe>. [Diakses pada tanggal: 11 Agustus 2008].
21. Anonymous. Liposome. 2006. Available at: <http://en.wikipedia.org/wiki/Liposome> [Diakses pada tanggal: 25 Juli 2008]
22. Hamada A, Kawaguchi T, Nakano M . Clinical Pharmacokinetics of Cytarabine Formulations. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41 (10): 705-71.
23. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965, 13:238-252

24. Darijanto ST. Pengembangan Sistem Penghantaran Obat Skopolamin HBr dalam Bentuk Liposom (abstrak). *Disertasi Program Studi Program Studi Ilmu Farmasi ITB, Program Doktor ITB, 2005. Available at: http://www.accessmylibrary.lib.itb.ac.id/coms2/summary_2086-27312686_ITM [Diakses pada tanggal: 25 Juli 2008]*
25. Monfardini C, Veronese FM. Stabilization of Substances in Circulation. *Bioconj Chem 1998;9 (4):418-450.*
26. Anonymous. Liposome: antigen vehicles. Available at: <http://www.exopol.com/in/base3.in.html>. [Diakses pada tanggal: 25 Juli 2008]
27. Sjahbanar SZ, Setiadi E(ed). Stryer L. Biokimia Vol 1. Edisi 4. Jakarta: EGC 2000:264-77.
28. Anonim. Liposome structure. Available at: http://www.cosmetic-liposome.com/liposome_structure.html. [Diakses pada tanggal: 25 Juli 2008]
29. Messersmith PB, Vallabhaneni S, Nguyen V. Preparation of calcium-loaded liposomes and their use in calcium phosphate formation. *Chem Mater 1998;10:109-116*
30. Lehninger AL. Dasar-dasar biokimia Jilid 1. Jakarta: Erlangga 1982:355-359.
31. Zumbuehl O, Weder HG. Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid / detergent mixed micelles. *Biochim Biophys Acta 1981; 640: 252-262*
32. Andrew M. Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging. *J Cont Release 2006;110:490-504.*
33. Karp G (ed). The structure and function of the plasma membrane. In: *Cell and Molecular Biology; Concept and Experiment*. 2nd ed. John Wiley & Sons Inc. 1999: 128-130
34. New RRC (ed). Introduction. In: *Liposomes. A Practical Approach*. IRL Press 1990:1-31.
35. Mayes AP. Lipid yang memiliki makna fisiologis. Dalam: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Biokimia Harper. Jakarta: EGC 2003;151-154
36. Kent C. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu Rev Biochem 1995;64:315-343.*
37. Wu NZ, Da D, Rudoll TL, Needham D, Whorton AR, Dewhirst MW. Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of stealth liposomes in tumor tissue. *Cancer Res 1993;53:3765-3770.*

38. Stern J, Freisleben HJ, Janku S, Ring K. Black Lipid Membranes of Tetraether Lipids from *Thermoplasma acidophilum* *Biochim Biophys Acta* 1992;1128: 227-36
39. Freisleben HJ, Henkel L, Gutermann R, Rudolph P, John G, Sternberg B, Winter S, Ring K. Fermentor Cultivation of *Thermoplasma Acidophilum* for the Production of Cell Mass and the Main Phospholipid Fraction. *Appl Microbial Biotech* 1994;40: 745-52.
40. Bakowsky U, Rothe U, Antonopoulos E, Martini T, Henkel L, Freisleben HJ. Monomolecular organization of the main tetraether lipid from *Thermoplasma acidophilum* at the water – air interface. *Chem Phys Lipids* 2000;105:31-42.
41. Polozova A, et al. Formation of homogenous unilamellar liposomes from an interdigitated matrix. *Biochim Biophys. Acta* 2005;1668:117-125.
42. Storm G, Crommelin DJA. Liposomes: Quo Vadis?. *Adv Drug Deliv* 1998;17:31–48
43. Lindsay R. Method for manufacturing liposomes. Available at: <http://www.freepatentsonline.com/4622188.html>. [Diakses pada tanggal: 26 Agustus 2008]
44. Zasadzinski JAN. Transmission electron microscopy observations of sonication-induced changes in liposome structure. *Biophys J* 1986;49:1119-1130.
45. Malvern. Liposomes Characterisation Including The Size and Zeta Potential Characterisation of Anionic and Cationic Liposomes. Available at: <http://www.azonano.com/Details.asp?ArticleID=1220>. [Diakses pada tanggal 26 Agustus 2008]
46. Oussoren C, Storm G, Crommelin DJA, Senior J. Liposomes for sustained drug release. In: Senior J, Radomsky M. Sustained-release Injectable Products. Interpharm Press. USA. 2000:137-80
47. Colletier JP, Chaize B, Winterhalter M, Fournier D: Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnol* 2002;2:9
48. Chaize B, Winterhalter M, Fournier D: Encapsulation of acetylcholinesterase in preformed liposomes. *Biotechniques* 2003;34:1158-60, 1162
49. Jenkins SA, Betageri GV, Parsons DL. Liposomes Drug Delivery Systems. Basel Technomic Publishing Co 1993;90:27-8.

50. New RRC. Characterization of Liposoms. In: New RRC. Liposomes. A Practical Approach. IRL Press 1991:105-61.
51. Albers SV, van de Vossenberg JL, Driessen AJ, Konings WN. Tetraether lipid. *Front Biosci* 2000;5:813-20.
52. Blöcher D, Ring K. Mixtures of tetraetherlipids from *Thermoplasma acidophilum* with varying degree of cyclization show a kinetic effect for a metastable phase. *Chem Phys Lipids* 1991;58:233–239.
53. Sprott DG, Patel GB, Choquet CG, Ekiel I. Formation of Stable Liposomes from Lipid Extract of Archaeobacteria (Archaea). 1993. Available at: <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=1993%2F08202&IA=WO1993%2F08202&DISPLAY=DESC>. [10 Desember 2008]
54. Sugai A, Sakuma R, Fukuda I, Kurosawa N, Itoh YI, Kon K, Ando S, Itoh T. The structure of the core polyol of the ether lipids from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Lipids* 1995;30:3-8.
55. Blöcher D, Gutterman R, Henkel B, Ring K. Physicochemical characterization of tetraether lipid from *Thermoplasma acidophilum*. V. Evidence for the existence of a metastable state in lipids with uncyclized hydrocarbon chains. *Biochem Biophys Acta* 1990;1024:54.
56. Blöcher D, Gutterman R, Henkel B, Ring K. Thermotropic properties of dispersions of cholesterol with tetraether lipids from *Thermoplasma acidophilum*. *Arch Biochem Biophys* 1991;290:224.
57. Anonymous. Sodium Chloride. 2005. Available at: http://en.wikipedia.org/wiki/sodium_chloride [Diakses pada tanggal: 25 Juli 2008]
58. Martini FH. The Chemical Level of Organization. In: Martini FH. Fundamentals of Anatomy and Physiology. 7th Edition. San Fransisco: Pearson Benjamin Chumings, 2006.p.28,41.
59. Anonymous. Dietary Reference Intake for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate. 2004. Available at: http://books.nap.edu/catalog.php?record_id=10925#toc [diakses pada tanggal: 26 Juli 2008]
60. Anonymous. Calcium Chloride. 2005. Available at: http://en.wikipedia.org/wiki/calcium_chloride [Diakses pada tanggal: 11 Agustus 2008].

61. Anonim. Calcium chloride. 2007. Available at: www.liquiddustlayer.com [Diakses pada tanggal: 11 Agustus 2008]
62. Mardalis. Metode penelitian: suatu pendekatan proposal. Jakarta: Bumi Aksara, 2007.p.53—108.
63. Sopiudin D. Statistika untuk kedokteran dan kesehatan. Seri 1. Jakarta: PT Arkans, 2004.p.85-121
64. Freisleben HJ. The main phospholipid of the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. Does the liposome Technology with this unique tetraether lipid provide novel perspectives for Biochemistry and Medicine?. Habilitation at Johann-Wolfgang, Goethe- University, Frankfurt am Main, 1992.



LAMPIRAN 1

- Hasil pengukuran diameter rata-rata Liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan NaCl 150 mOsmol pH 7 dan CaCl₂ pada hari ke-1.

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 1	85.85	-
	75.02	-
	44.34	-
	52.12	-
	68.62	-
	52.37	-
	56.45	-
	85.34	-
	86.66	-
	89.35	-
Rata-rata	69.61	0

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 2	75.16	-
	46.55	-
	74.01	-
	54.99	-
	71.08	-
	79.41	-
	38.24	-
	40.53	-
Rata-rata	60,00	0

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 3	54.48	-
	80.57	-
	46.86	-
	61.91	-
	60.10	-
	79.21	-
	62.53	-
	52.14	-
	65.28	-
	53.53	-
Rata-rata	61.66	0

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 4	67.66	-
	80.47	-
	57.56	-
	49.49	-
	75.33	-
	74.61	-
	73.70	-
	76.19	-
	68.27	-
	54.72	
Rata-rata	67,80	0

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 5	90.32	-
	80.97	-
	78.69	-
	92.87	-
	79.35	-
	87.20	-
	72.83	-
	76.28	-
	90.32	-
	80.97	-
Rata-rata	83,16	0

- Hasil pengukuran diameter rata-rata Liposom diameter Liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan NaCl 150 mOsmol pH 7 dan CaCl₂ pada hari ke-90

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 1	92.13	103.56
	83.53	107.78
	74.71	109.67
	64.29	114.81
	96.27	127.88
	59.43	107.59
		107.49
		110.21
		140.33
Rata-rata	78,73	114.37

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 2	88.18	132.01
	84.29	129.89
	86.35	134.69
	57.57	101.70
	60.99	136.62
	79.79	127.54
	82.22	128.97
Rata-rata	77,06	127,35

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 3	97.05	110.37
	93.27	102.66
	96.38	108.66
	64.84	108.04
	91.97	110.70
	85.33	108.82
	69.44	133,00
	94.27	155.98
		116.37
		135.23
Rata-rata	86,57	118,98

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 4	94.75	157.78
	81.14	151.97
	69.12	140.41
	94.28	109.29
	99.38	120.06
	73.77	136.39
	62.51	
	78.52	
	82.56	
Rata-rata	81,17	135,98

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 5	75.63	142.23
	80.97	117.90
	80.38	
	50.30	
	70.73	
	83.68	
	82.08	
	75.44	
	98.16	
	69.68	
	Rata-rata	76,82

- Hasil pengukuran diameter rata-rata Liposom diameter Liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 dan CaCl₂ pada hari ke-1

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 1	93.06	115.66
	64.07	
	44.88	
	80.53	
	67.84	
	95.34	
	93.33	
	42.57	
	99.01	
47.59		
Rata-rata	72,82	115.66

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 2	92.19	108.81
	57.02	107.23
	68.44	100.63
	49.13	108.80
	63.11	
	82.61	
	78.17	
	72.47	
Rata-rata	70,39	106,37

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 3	90.62	121.88
	49.95	116.21
	44.73	114.99
	73.53	109.71
	88.27	
	52.26	
	58.00	
	92.51	
	83.90	
	64.71	
Rata-rata	69,85	128,20

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 4	60.10	110.76
	55.95	110.71
	87.76	110.52
	90.09	
	80.39	
	75.97	
	89.52	
	58.39	
	54.20	
69.10		
Rata-rata	72,15	110,66

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 5	67.05	118.48
	78.72	121.45
	98.46	113.59
	69.55	
	68.65	
	66.51	
	82.72	
	76.30	
	66.78	
Rata-rata	74,97	117,84

- Hasil pengukuran diameter rata-rata Liposom diameter Liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 dan CaCl_2 pada hari ke-90

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 1	56.73	102.05
	47.41	130.24
	80.50	112.74
	39.96	109.21
	53.18	
Rata-rata	55,56	113,56

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 2	98.90	106.84
	95.53	134.10
	96.45	127.37
	84.83	
	79.87	
	57.09	
	75.52	
	52.13	
	74.02	
	91.59	
75.52		
Rata-rata	80,59	122,77

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 3	69.14	129.62
	56.03	
	56.56	
	48.91	
	87.76	
	59.15	
	58.86	
	75.30	
	45.52	
	52.93	
Rata-rata	61,02	129,62

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 4	87.73	113.23
	45.10	108.73
	72.76	114.34
	78.11	127.02
	71.59	124.49
	80.54	143.41
Rata-rata	72,64	121,87

Foto	Liposom Kecil (≤ 100 nm)	Liposom Besar (> 100 nm)
Foto 5	109.46	109.46
	154.24	154.24
	66.52	126.59
	99.04	140.03
	57.45	
	50.63	
	66.49	
56.23		
Rata-rata	71,59	132,58