



**BIODEGRADASI TETRAETER LIPID DALAM
FORMULASI LIPOSOM EPC-TEL 2,5 PADA
HEPAR: STUDI *IN VIVO* PADA MENCIT C3H**

OLEH

**Fatimah Saidah
010500711X**

SKRIPSI

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

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA, AGUSTUS 2008**

LEMBAR PENGESAHAN

SKRIPSI

**BIODEGRADASI TETRAETER LIPID DALAM FORMULASI
LIPOSOM EPC-TEL 2,5 PADA HEPAR: STUDI *IN VIVO* PADA
MENCIT C3H**

**Fatimah Saidah
010500711X**

PEMBIMBING

**dr. Siti Farida, M Kes
NIP. 132 161 205**

**MENGETAHUI
KETUA MODUL RISET 2007-2008**

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

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT penulis panjatkan karena hanya dengan rahmat-Nya lah penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan penelitian dengan judul “Biodegradasi Tetraeter Lipid dalam Formulasi Liposom EPC-TEL 2,5 pada Hepar: Studi *in vivo* pada Mencit C3H” ini.

Laporan penelitian ini tidak akan terselesaikan tanpa dukungan dan bantuan berbagai pihak. Maka pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terimakasih yang sedalam-dalamnya kepada:

1. dr. Siti Farida, M Kes dan Dr. dr. Ernie H. Purwaningsih, MS selaku dosen pembimbing penelitian yang telah meluangkan banyak waktu untuk memberikan bimbingan, masukan, dan bantuan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan laporan ini.
2. Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudi, SpFK dan Dr. dr. Saptawati Bardosono, MSc yang telah memberi masukan yang bermanfaat kepada penulis.
3. Ibu Meta dari Departemen Farmakologi, yang telah membantu penulis memahami kromatografi lapis tipis.
4. Staf dan karyawan Departemen Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, yaitu Ibu Ani Widayati, Ibu Sri Wulandari, Pak Rusyono, dan Pak Sukidi yang membantu kelancaran proses jalannya penelitian ini dari awal hingga akhir.
5. Dra. Puspita E. Wuyung MS dan Pak Slamet dari bagian Patologi Anatomi yang telah menyediakan dan memelihara mencit C3H yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini.
6. Ibu Ima dan Bapak Sarwono yang telah membantu menyediakan bahan-bahan kimia yang dibutuhkan dalam penelitian ini.
7. Departemen Farmasi, Farmakologi, dan Biokimia yang telah menyediakan alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini.
8. Teman-teman seperjuangan dalam riset mengenai liposom, khususnya Agung, Angga, Satrio, dan Yani. Terima kasih telah saling membantu, mendukung, dan memberi semangat selama proses penelitian ini.
9. Orangtua penulis atas doa, pengertian, dan dorongan semangat yang selalu diberikan kepada penulis.

10. Teman-teman angkatan 2005 lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah memberikan dukungan kepada penulis untuk terus semangat dalam melaksanakan penelitian dan menuliskan laporan penelitian ini.

Penulis sangat menyadari bahwa masih terdapat banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari pembaca.

Akhir kata, penulis berharap laporan penelitian ini dapat bermanfaat dalam menambah khasanah ilmu pengetahuan bagi pembaca dan peneliti yang ingin menjadikan penelitian ini sebagai langkah awal untuk lahirnya penelitian lain yang dapat membawa manfaat bagi masyarakat.

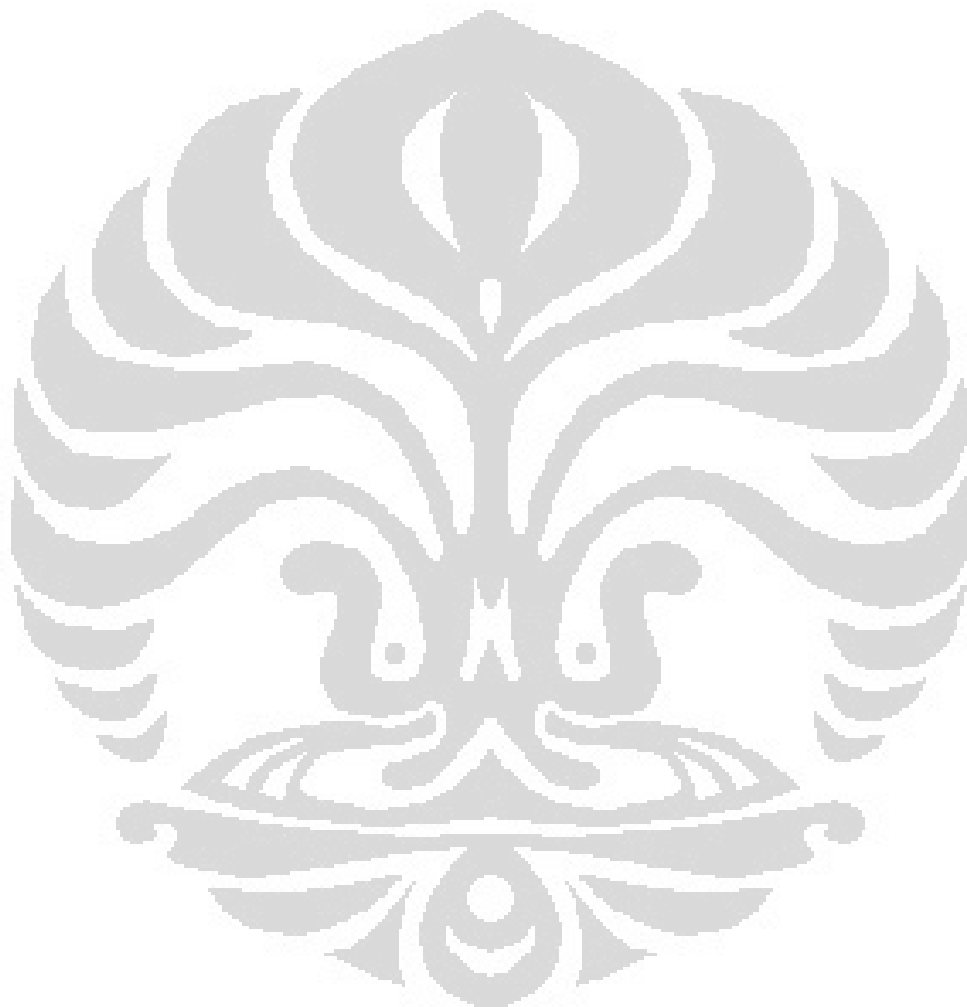
Jakarta, Agustus 2008

Penulis

DAFTAR ISI

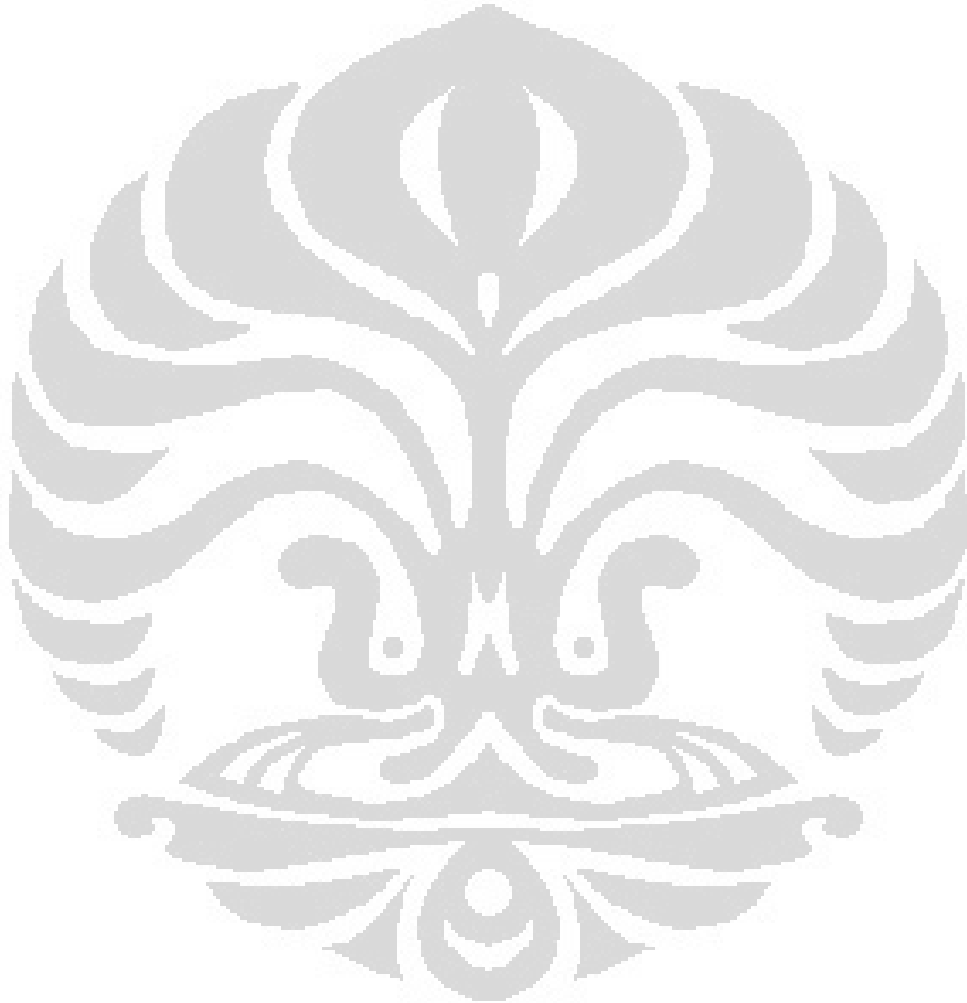
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR SINGKATAN.....	viii
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT.....	x
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	2
1.3. Hipotesis.....	2
1.4. Tujuan.....	2
1.5. Manfaat Penelitian.....	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Pembawa Obat.....	4
2.2. Struktur Liposom.....	5
2.3. Liposom dalam Lingkungan Biologis.....	8
2.3.1. Interaksi Liposom dengan Sel.....	8
2.3.2. Nasib Liposom di Dalam Tubuh.....	10
2.4. Tetraeter Lipid.....	13
2.5. Kromatografi Lapis Tipis.....	14
2.5.1. Teknik Kromatografi Lapis Tipis.....	14
2.5.2. Prinsip Kerja.....	16
2.5.3. Kromatografi Lapis Tipis pada Lipid.....	17
2.6. Mencit C3H.....	18
2.7. Injeksi Intraperitoneal pada Mencit.....	18
2.8. Kerangka Konsep.....	19

BAB III. METODOLOGI	
3.1. Desain Penelitian.....	20
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	20
3.3. Populasi Penelitian.....	20
3.4. Kriteria Inklusi.....	20
3.5. Besar Sampel.....	20
3.6. Alat dan Bahan.....	22
3.7. Cara Kerja.....	23
3.7.1. Pembuatan Liposom.....	23
3.7.2. Penyuntikan Liposom pada Mencit dan Pengambilan Hepar.....	24
3.7.3. Ekstraksi Hepar.....	25
3.7.4. Persiapan Kalibrasi.....	26
3.7.5. Kromatografi Lapis Tipis.....	27
3.8. Definisi Operasional.....	29
3.9. Identifikasi Variabel.....	30
3.10. Analisis Data.....	30
3.11. Masalah Etika.....	31
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Hasil Penelitian.....	32
4.2. Pembahasan.....	34
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan.....	40
5.2. Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN 1. Jadwal Kegiatan Penelitian	44
LAMPIRAN 2. Perhitungan Dosis Liposom dan Kalibrasi	45
LAMPIRAN 3. Data Mencit	48



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Langkah-langkah penentuan uji statistik dalam penelitian.....	30
Tabel 2. Jadwal kegiatan penelitian.....	44
Tabel 3. Data berat mencit dan hepar mencit yang digunakan dalam penelitian..	48



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Representasi skematik liposom.....	5
Gambar 2. Mekanisme transfer dimediasi kontak.....	8
Gambar 3. Interaksi liposom dengan sel dengan dan tanpa ambilan isi liposom...	9
Gambar 4. Pengambilan liposom dengan fagositosis.....	10
Gambar 5. Penjenuhan wadah dengan eluen.....	15
Gambar 6. Skema plat KLT.....	16
Gambar 7. Kerangka konsep penelitian.....	19
Gambar 8. Skema plat KLT yang digunakan dalam penelitian.....	27
Gambar 9. Hasil KLT pada pengulangan pertama.....	32
Gambar 10. Hasil KLT pada pengulangan kedua, ketiga, dan keempat.....	33
Gambar 11. Perbandingan bercak TEL pada penelitian Purwaningsih dan penelitian ini dengan eluen kloroform-etanol 9:1.....	38
Gambar 12. Rotavapor vacuum pump waterbach Buchi.....	49
Gambar 13. Alat sentrifugasi Sorvall Biofuge Primo.....	49
Gambar 14. Timbangan gram.....	50
Gambar 15. Timbangan miligram.....	50
Gambar 16. Timbangan mikrogram Mettler AE 200.....	50
Gambar 17. <i>Microliter Syringes</i> Hamilton.....	51
Gambar 18. <i>Micropipette</i> Socorex.....	51
Gambar 19. <i>TLC sheet silica gel 60 F254</i> Merck.....	51
Gambar 20. <i>Chamber</i> atau wadah yang digunakan pada KLT.....	52
Gambar 21. Larutan tembaga asetat 3% dan asam fosfat 8%.....	52

DAFTAR SINGKATAN

- EPC : *Egg yolk Phosphatidil Choline*
HDL : *High Density Lipoprotein*
IUV : *Intermediate-sized Unilamellar Vesicle*
KLT : Kromatografi Lapis Tipis
LUV : *Large Unilamellar Vesicle*
MLV : *Multilamellar Vesicle*
PEG : *Polyethylene Glycol*
RES : *Reticuloendothelial system*
Rf : *Retention Factor*
SUV : *Small Unilamellar vesicle*
TEL : Tetraeter Lipid
TLC : *Thin Layer Chromatography*
UV : Ultraviolet



ABSTRAK

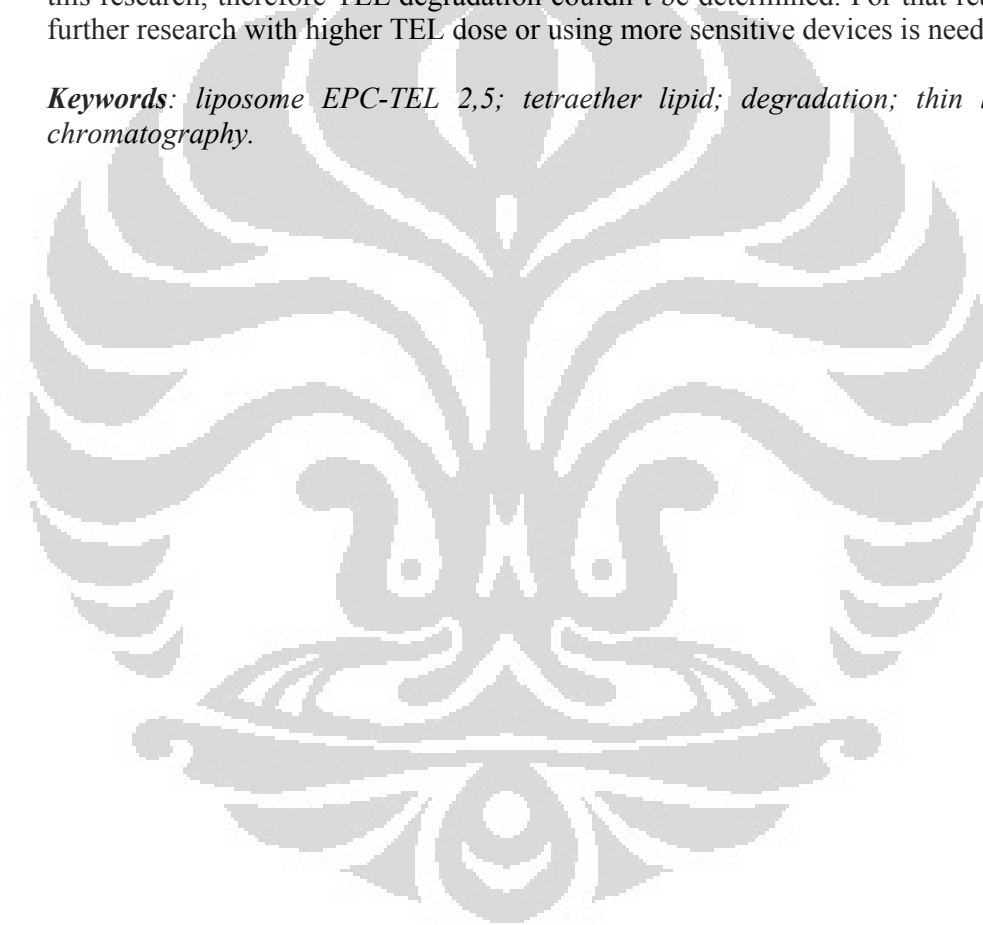
Liposom EPC-TEL 2,5 adalah salah satu formulasi liposom yang sedang dikembangkan untuk menambah kestabilan liposom sebagai pembawa obat. Liposom ini dibuat dari kombinasi fosfatidil kolin kuning telur (*Egg yolk Phosphatidil Choline/EPC*) dan Tetraeter Lipid (TEL) 2,5 mol %. TEL yang digunakan berasal dari membran Archaea *Thermoplasma acidophilum*. Biodegradasi liposom ini belum pernah diuji, terutama apakah TEL dalam formulasi liposom EPC-TEL 2,5 dapat terdegradasi oleh tubuh, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Dalam penelitian ini dilakukan uji biodegradasi *in vivo* dengan mengukur degradasi TEL dalam suspensi sel hepar mencit. Penilaian terdegradasi atau tidaknya TEL dilakukan dengan membandingkan *Retention Factor* (Rf) bercak TEL pada kontrol dan hepar mencit 4 jam setelah injeksi liposom intraperitoneal pada plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada hasil KLT, baik pada kelompok perlakuan maupun kontrol tidak ditemukan bercak TEL sehingga ada atau tidaknya degradasi TEL oleh hepar belum dapat diketahui dari hasil penelitian ini. Untuk itu dibutuhkan penelitian lanjutan menggunakan dosis TEL yang lebih tinggi atau alat yang dapat mendeteksi partikel dengan ukuran yang lebih kecil.

Kata kunci: liposom EPC-TEL 2,5; tetraeter lipid; degradasi; kromatografi lapis tipis.

ABSTRACT

EPC-TEL 2.5 liposome is one of liposome formulas currently developed to increase liposome's stability as drug carrier. The liposome is made from lecithin / Egg yolk Phosphatidil Choline (EPC) and 2.5 mol % Tetraether Lipid (TEL). This experiment was conducted to test degradation of this liposome in liver *in vivo*, specifically to know whether TEL in EPC-TEL 2.5 was degraded or not by mice liver 4 hours after intraperitoneal liposome injection. TEL degradation was evaluated by comparing the Retention Factor (Rf) of TEL spot of analyzed mice liver suspension to the Rf of control sample. Unfortunately, TEL spot of analyzed mice liver suspension and control sample was not detected by TLC sheet used in this research, therefore TEL degradation couldn't be determined. For that reason, further research with higher TEL dose or using more sensitive devices is needed.

Keywords: *liposome EPC-TEL 2,5; tetraether lipid; degradation; thin layer chromatography.*



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pada penyakit yang membutuhkan terapi jangka panjang seperti kanker, diabetes mellitus, arthritis reumatik, dan pasca transplantasi organ, diperlukan terapi obat dengan dosis tinggi dalam jangka panjang. Oleh karena itu efek samping yang ditimbulkan juga besar.^{1,2}

Sampai saat ini sudah dilakukan berbagai penelitian dan upaya agar efek samping obat dapat dikurangi. Kombinasi disiplin ilmu imunologi dan pengantaran obat telah menjadi suatu pendekatan yang menjanjikan dalam pengobatan kanker dan penyakit-penyakit lainnya. Salah satu cara yang sedang dikembangkan adalah dengan menginkorporasikan obat ke dalam pembawa obat, sehingga obat dapat langsung mencapai organ sasaran.² Salah satu pembawa obat yang telah diteliti dan terbukti dapat mengurangi efek samping obat adalah liposom.

Liposom dapat dibuat dari berbagai komponen lipid, misalnya asam lemak, derivat kolesterol, dan fosfolipid. Penggunaan berbagai komponen lipid ditujukan untuk membuat struktur liposom semirip mungkin dengan membran biologis. Karena fosfolipid adalah struktur utama dari membran biologi, maka komponen utama dalam pembuatan liposom adalah fosfolipid. Fosfolipid yang paling umum digunakan dalam pembuatan liposom adalah fosfatidil kolin.³

Untuk meningkatkan kestabilan liposom telah dicoba berbagai cara, antara lain dengan mencampurkan jenis lipid lain dengan fosfolipid.³ Salah satu lipid yang telah diteliti adalah Tetraeter Lipid (TEL). TEL yang digunakan merupakan hasil ekstraksi membran *Archaea*, antara lain dari *Sulfolobus acidocaldarius* atau *Thermoplasma acidophilum*.⁴

Liposom EPC-TEL 2,5 adalah salah satu formulasi liposom yang sedang dikembangkan. Liposom ini dibuat dari kombinasi lesitin/fosfatidil kolin kuning telur (*Egg yolk Phosphatidil Choline*/EPC) dan TEL 2,5 mol %. Liposom EPC-TEL 2,5 dapat mengikat obat metilprednisolon palmitat lebih baik dan terbukti lebih efektif, serta terdistribusi baik dalam organ dibandingkan dengan

metilprednisolon palmitat tanpa liposom.⁵ Namun sebagai pembawa obat yang baik, liposom ini harus bersifat biokompatibel, yaitu mudah terdegradasi dalam tubuh, tidak toksik, dan tidak menyebabkan respon imun.⁶ TEL dari *Thermoplasma acidophilum* telah diteliti dan terbukti bersifat tidak toksik, tidak mutagenik atau antimutagenik pada uji toksisitas akut,⁴ namun apakah TEL ini dapat terdegradasi dalam tubuh (terutama oleh hepar), baik secara *in vitro* maupun *in vivo* belum diuji. Untuk membuktikan bahwa TEL pada liposom EPC-TEL 2,5 mudah didegradasi sehingga tidak menimbulkan efek samping jangka panjang, perlu dilakukan penelitian mengenai biodegradasinya dalam tubuh.

1.2. Perumusan Masalah

Apakah TEL dari *Thermoplasma acidophilum* dalam liposom EPC-TEL 2,5 terdegradasi oleh hepar mencit secara *in vivo* 4 jam setelah injeksi liposom intraperitoneal?

1.3. Hipotesis

TEL dari *Thermoplasma acidophilum* dalam liposom EPC-TEL 2,5 didegradasi oleh hepar mencit secara *in vivo* 4 jam setelah injeksi liposom intraperitoneal.

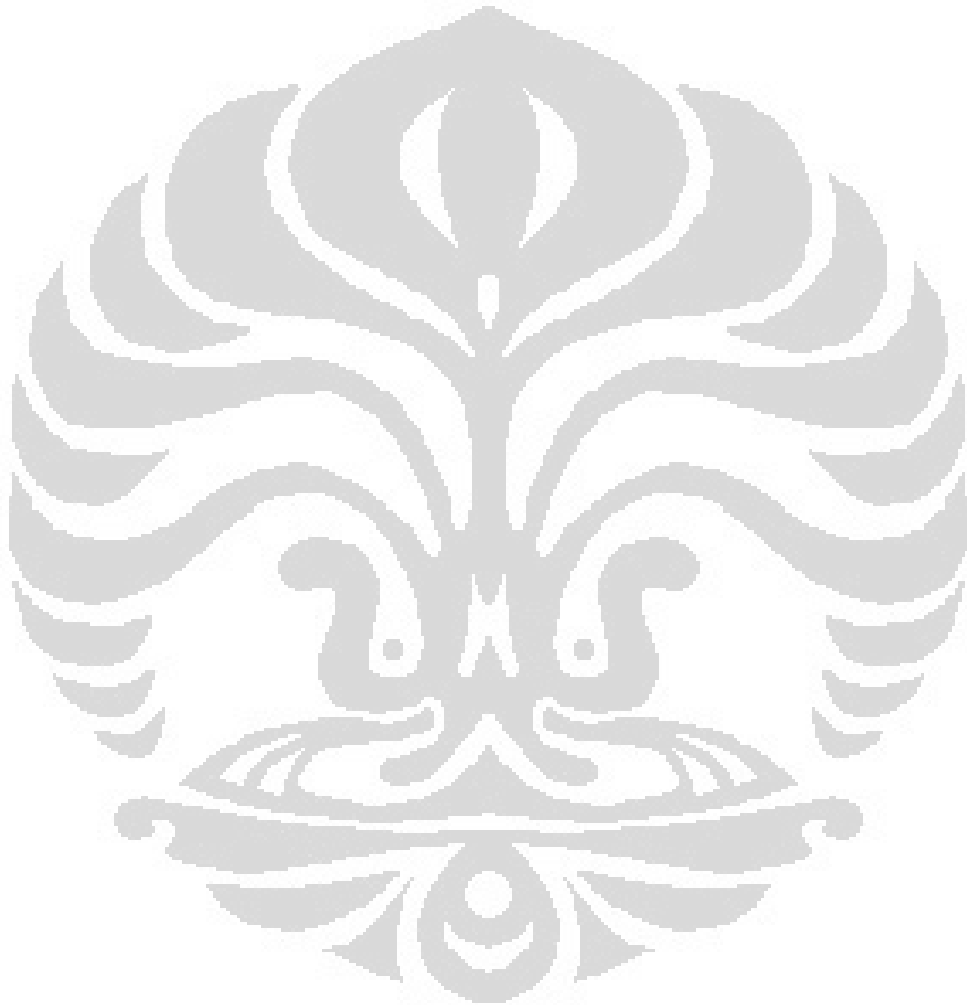
1.4. Tujuan

Untuk membuktikan bahwa liposom EPC-TEL 2,5 aman digunakan dalam pengobatan jangka panjang dengan mengukur hasil biodegradasi TEL secara *in vivo*.

1.5. Manfaat Penelitian

Bila liposom EPC-TEL 2,5 terbukti mudah didegradasi oleh sel hepar, maka formulasi liposom ini telah memenuhi salah satu syarat sebagai pembawa obat yang baik. Penelitian lanjutan mengenai stabilitas liposom ini secara *in vivo* dibutuhkan agar liposom ini dapat dimanfaatkan sebagai pembawa obat yang efektif. Obat-obat yang diinkorporasikan dapat berupa obat-obat untuk terapi

jangka panjang sehingga dosis obat menjadi lebih rendah. Dengan demikian efek samping obat dapat ditekan serendah mungkin.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pembawa Obat

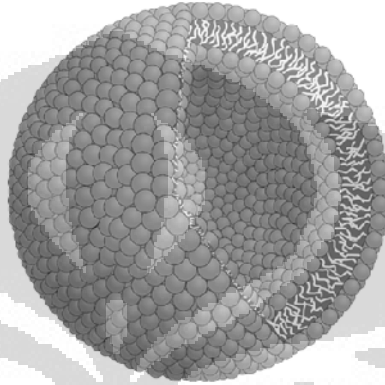
Penggunaan obat selalu mengkompromikan efek terapi dengan efek samping. Pembawa obat adalah substansi yang digunakan untuk meningkatkan pengantaran dan tingkat efektivitas obat. Pembawa obat tidak hanya memungkinkan pengantaran obat dengan konsentrasi yang lebih tinggi, namun juga memungkinkan penargetan spesifik pada sel atau organ tertentu. Dengan berkurangnya distribusi obat ke jaringan yang bukan merupakan target organ, efek samping yang berbahaya pada organ-organ vital dapat dikurangi.⁷

Berbagai jenis dan bentuk pembawa obat dipilih untuk dikembangkan berdasarkan berbagai pertimbangan. Faktor yang dipertimbangkan adalah struktur, sifat fisik dan kimia obat, bentuk dan letak reseptor obat pada sel, mekanisme interaksi antara obat dengan pembawa obat, dan interaksi antara pembawa obat dengan organ atau sel sasaran. Pemilihan pembawa obat juga didasarkan pada pertimbangan-pertimbangan tersebut. Misalnya, obat yang non-polar dengan reseptor pada membran sel akan mudah berikatan dengan pembawa obat berupa lipid. sebaliknya, obat yang polar dapat berikatan dengan pembawa obat yang cocok, misalnya peptida.⁸ Selain itu suatu pembawa obat harus memenuhi beberapa persyaratan, yaitu bersifat tidak toksik, biokompatibel, tidak mutagenik maupun imunogenik bagi tubuh, serta mudah didegradasi di dalam tubuh.⁶

Liposom adalah salah satu pembawa obat yang telah diteliti dan terbukti dapat mengurangi efek samping obat. Pada awalnya, liposom hanya digunakan untuk mempelajari proses biologis membran dan ikatan membran protein pada berbagai eksperimen dalam biologi molekular karena struktur dan komposisinya mirip dengan membran sel.^{9,10} Saat ini penggunaan liposom sebagai pembawa obat telah banyak dan masih terus diteliti untuk memperoleh suatu sediaan yang cocok dan tepat, sesuai dengan tujuan penggunaan pembawa obat, baik untuk aplikasi topikal, parenteral, atau (masih dimungkinkan) penggunaan secara oral.⁸

2.2. Struktur Liposom

Struktur liposom ditemukan pertama kali oleh Alec Bangham dari Cambridge pada awal tahun 1960.^{8,11} Liposom merupakan suatu gelembung sferis tertutup yang terdiri dari lemak lapis ganda (*lipid bilayer*).⁷ Gambar skematik liposom dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Representasi skematik liposom⁷

Liposom dapat dibentuk dengan cara mendispersikan berbagai macam lipid baik alami atau sintetik ke dalam media cair, sehingga terbentuk vesikel sferis yang terdiri dari molekul hidrofilik yang dikelilingi oleh molekul hidrofobik.^{2,5} Biasanya liposom dibuat dari lipid alami agar bersifat biokompatibel, yaitu dapat didegradasi (*biodegradable*), tidak toksik, dan tidak menimbulkan respon imun.⁶

Penggunaan berbagai komponen lipid dilakukan untuk membuat struktur liposom semirip mungkin dengan membran biologis. Sifat liposom yang sama dengan membran natural dengan jalur degradasi yang sama membuat liposom aman dan efektif untuk aplikasi medik. Karena fosfolipid adalah struktur utama dari membran biologi, maka komponen utama dalam pembuatan liposom adalah fosfolipid. Fosfolipid yang paling umum digunakan dalam pembuatan liposom adalah fosfatidil kolin.^{3,7}

Fosfatidil kolin, disebut juga lesitin, adalah molekul amfifatik yang terdiri dari sepasang rantai acyl hidrokarbon bersifat hidrofobik yang dihubungkan oleh gliserol dan gugus kepala hidrofilik. Molekul fosfatidil kolin tidak larut dalam air,

dan di dalam media cair secara spontan membentuk lapisan *bilayer* planar untuk meminimalisir interaksi antara media cair dengan rantai asam lemak hidrokarbon. Interaksi ini akan benar-benar tereliminasi ketika lapisan bilayer melipat dan membentuk vesikel yang tertutup. Hal ini sangat berbeda dengan molekul amfifatik lain seperti *detergent* dan lisolesitin yang memiliki gugus kepala polar dan hanya satu rantai hidrofobik. Dengan satu rantai hidrofobik, interaksi antar molekul *detergent* tidak membentuk lapisan bilayer, melainkan *micelle*.³ Keunggulan lainnya adalah fosfatidil kolin bermuatan netral dan merupakan zwitter ion pada seluruh pH sehingga dapat membentuk struktur lamelar pada pH larutan berapapun.⁷ Fosfatidil kolin dapat dibuat dari bahan alami maupun sintetis. Umumnya fosfatidil kolin dibuat dari kuning telur atau kacang kedelai. Sifat-sifat fosfatidil kolin di atas ditambah dengan harganya yang relatif rendah dibandingkan fosfolipid lain menjadikan fosfatidil kolin komponen utama liposom yang digunakan dalam aplikasi yang luas.³

Selain fosfatidil kolin, liposom dapat juga mengandung lipid atau zat lain. Lipid bermuatan seperti fosfatidilserin atau fosfatidilgliserol seringkali ditambahkan sebagai stabilisator. Kolesterol juga dapat ditambahkan untuk memperbaiki stabilitas mekanis dan menurunkan kebocoran senyawa aktif melalui membran.⁸ Beberapa zat lain yang juga dapat ditambahkan untuk meningkatkan stabilitas liposom adalah vitamin E¹⁰, kombinasi vitamin E dan A¹², serta asam fosfatidat⁸. Lipid lain yang dapat digunakan sebagai stabilisator membran liposom adalah Tetraeter Lipid (TEL) dari membran sel Archaea, antara lain *Thermoplasma acidophilum*^{13,14} dan *Sulfolobus acidocaldarius*.¹⁵

Ukuran liposom bervariasi dari 20 nm hingga beberapa mikrometer, dan dapat terdiri dari satu atau beberapa membran konsentris (membran unilamellar atau multilamellar).^{7,16} Berdasarkan ukuran dan jumlah lapisan membrannya, liposom dapat dibagi menjadi beberapa kategori:

1. Vesikel multilamellar atau *Multilamellar Vesicle* (MLV). Biasanya terdiri dari vesikel berukuran 100-1000 nm, tiap vesikel terdiri dari lima atau lebih lamela konsentris. Vesikel yang hanya terdiri dari beberapa lamela kadang disebut liposom oligolamellar atau vesikel paucilamellar.³

2. Vesikel unilamellar kecil atau *Small Unilamellar Vesicle* (SUV). Adalah liposom dengan ukuran terkecil yang mungkin bagi vesikel fosfolipid (20-100 nm).^{3,16} Batas ukuran terkecil bervariasi tergantung pada komposisi membran liposom.
3. Vesikel unilamellar besar atau *Large Unilamellar Vesicle* (LUV). Liposom ini memiliki diameter sampai 1000 nm.³
4. Vesikel unilamellar sedang atau *Intermediate-sized Unilamellar Vesicle* (IUV). Istilah ini tidak umum ditemukan pada literatur, namun pada beberapa literatur IUV disebutkan untuk liposom dengan diameter sampai dengan 100 nm.³

Ukuran liposom ditentukan oleh beberapa hal, antara lain jenis lipid dan kombinasinya serta cara pembuatannya. Untuk aplikasi di bidang kedokteran, digunakan liposom berukuran 80-200 nm. Ukuran liposom dapat dibuat homogen dengan cara diekstrusi beberapa kali melalui membran polikarbonat hingga ukuran yang dikehendaki tercapai atau dengan cara sonikasi. Diameter liposom dapat diukur dengan *particle sizer* atau dengan mikroskop elektron.⁸

Jumlah lapisan membran liposom ditentukan oleh cara pembuatannya. Liposom yang dibuat dengan cara *hand shaken*, *reverse phase evaporation*, atau *Freeze-thawing sonication* akan berbentuk multilamellar dan berukuran besar (MLV). Ukuran liposom tersebut dapat dibuat menjadi unilamellar dan berukuran kecil (SUV) dengan ekstrusi atau sonikasi.⁸

Sebagai pembawa obat, salah satu kelebihan liposom adalah karakter ampifiliknya. Struktur liposom dengan lapis ganda hidrofobik dan lapisan hidrofilik diantaranya memungkinkan liposom membawa obat hidrofobik maupun hidrofilik.⁷ Molekul obat atau substansi yang larut lemak (hidrofobik) dapat diinkorporasikan pada membran liposom.³ Substansi yang larut air dapat terlarut dalam dwilapis lipid atau terlarut di dalam vesikel.⁸ Untuk molekul yang larut lemak, jumlah maksimum molekul yang dapat dibawa oleh liposom berbanding langsung dengan kuantitas komponen membran dan tidak dipengaruhi oleh ukuran liposom. Dengan kata lain, MLV adalah jenis liposom pilihan. Untuk molekul larut air yang terlarut dalam vesikel, jumlah molekul yang dapat dibawa bergantung pada volume liposom. LUV atau IUV adalah tipe liposom yang tepat,

namun untuk mengantisipasi kebocoran liposom dalam plasma, liposom oligolamellar lebih direkomendasikan.³

2.3. Liposom dalam Lingkungan Biologis

2.3.1. Interaksi Liposom dengan Sel

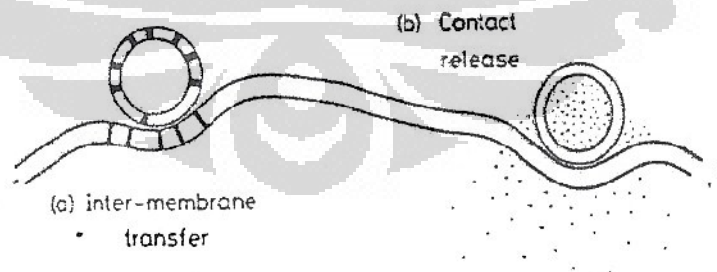
Di dalam tubuh, liposom dapat berinteraksi dengan sel melalui beberapa cara, yaitu:³

1. Transfer intermembran

Transfer intermembran komponen-komponen lipid dapat terjadi ketika dua lapisan fosfolipid bertemu tanpa harus ada gangguan pada liposom dan integritas membran. Transfer intermembran memungkinkan retensi sempurna isi dari liposom yang berada di media cair. Pada transfer intermembran, materi lipofilik yang ada pada membran liposom dapat masuk ke dalam membran yang berdekatan dengan membran lain sehingga jarak antara kedua membran ini cukup untuk mencegah materi yang akan ditansfer terpecah oleh fase cair (cairan interstitial).

2. *Contact Release*

Cara ini dapat terjadi ketika membran sel dan membran liposom bertemu yang menyebabkan peningkatan permeabilitas membran liposom, sehingga terjadi pelepasan zat larut air dengan konsentrasi tinggi yang berada dekat dengan membran sel (*leakage*).



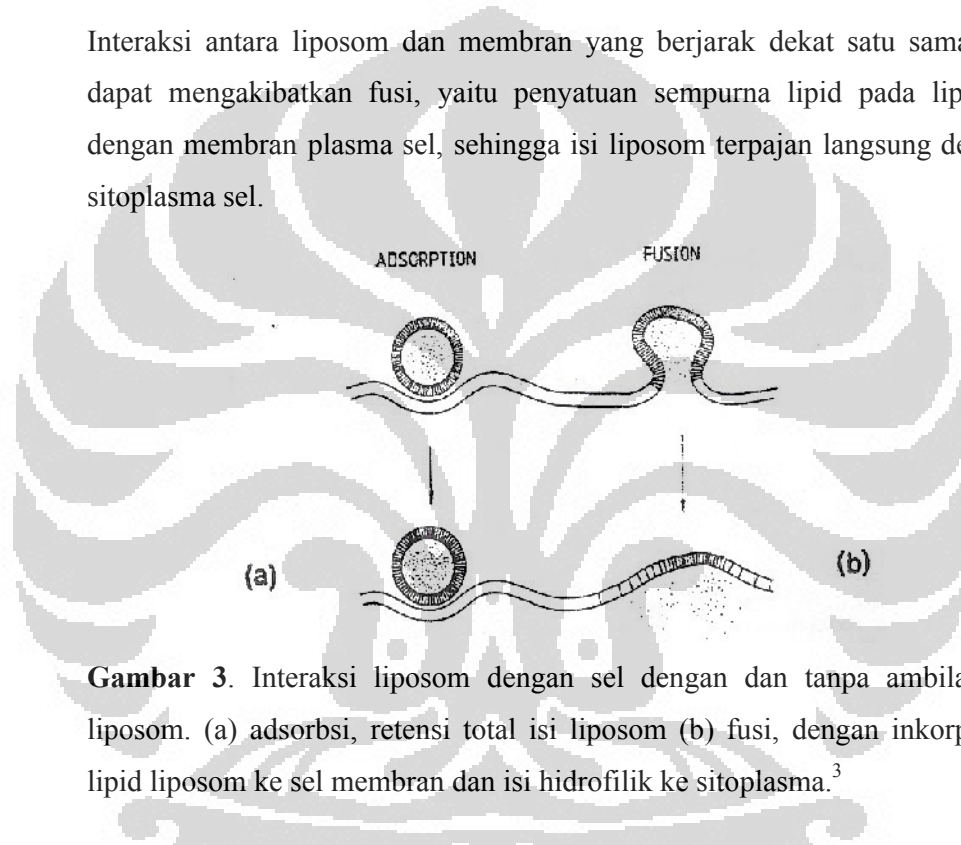
Gambar 2. Mekanisme transfer dimediasi kontak. Di atas mengilustrasikan cara isi liposom dapat diinkorporasikan ke dalam sel tanpa internalisasi liposom. (a) transfer intermembran (b) *contact release*.³

3. Adsorpsi

Adsorpsi liposom dalam permukaan sel dapat terjadi dengan sedikit atau tanpa internalisasi, baik komponen lipid maupun komponen cair. Adsorpsi dapat terjadi karena gaya tarik dan reseptor spesifik yang peka terhadap ligan di membran vesikel (liposom). Dapat dikatakan, adsorpsi liposom dapat terjadi melalui ikatan protein permukaan spesifik pada sel.

4. Fusi

Interaksi antara liposom dan membran yang berjarak dekat satu sama lain dapat mengakibatkan fusi, yaitu penyatuan sempurna lipid pada liposom dengan membran plasma sel, sehingga isi liposom terpajan langsung dengan sitoplasma sel.

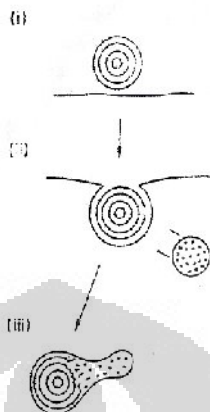


Gambar 3. Interaksi liposom dengan sel dengan dan tanpa ambilan isi liposom. (a) adsorpsi, retensi total isi liposom (b) fusi, dengan inkorporasi lipid liposom ke sel membran dan isi hidrofilik ke sitoplasma.³

5. Fagositosis

Pengambilan liposom melalui fagositosis terjadi oleh beberapa tipe sel tertentu contohnya makrofag. Fagositosis terjadi melalui adsorpsi liposom yang diikuti invaginasi oleh membran sel dan diselubungi oleh membran plasma sel untuk membentuk endosom dimana liposom akan dibawa untuk berinteraksi dengan enzim-enzim lisosom yang dapat mendegradasi membran liposom. Setelah membran liposom terdegradasi, fosfolipid akan dihidrolisis menjadi asam lemak yang akan dimetabolisme kembali dan diinkorporasi ke dalam fosfolipid dari sel itu sendiri.

PHAGOCYTOSIS OF LIPOSOMES



Gambar 4. Pengambilan liposom dengan fagositosis. Pada beberapa sel, seperti makrofag, tahap adsorpsi: (i) diikuti dengan invaginasi membran sel, (ii) membentuk vakuol endositik dimana liposom dibawa untuk bertemu dengan enzim lisosom yang dapat memecah membran liposom, (iii) berbeda dengan fusi, pada fagositosis seluruh lipid liposom diinternalisasi.³

2.3.2. Nasib Liposom di Dalam Tubuh

Liposom saat ini dapat digunakan antara lain dalam diagnosis, kemoterapi kanker, terapi imun, dan terapi gen. Liposom dapat dimasukkan ke dalam tubuh melalui berbagai rute. Rute yang sering digunakan adalah parenteral, yaitu intravena, intramuskular, subkutan, atau intraperitoneal. Administrasi topikal belum banyak digunakan, sedangkan liposom yang diberikan per oral, sebagaimana lipid lainnya, akan dipecah secara enzimatik sebelum masuk ke sirkulasi darah.^{3,6,8}

Sampai saat ini, rute administrasi liposom yang paling sering digunakan adalah intravena. Setelah memasuki aliran darah, liposom mengalami dua reaksi penting, yaitu interaksi dengan lipoprotein dan opsonin. Interaksi dengan lipoprotein, terutama *High Density Lipoprotein* (HDL), menyebabkan terjadinya pertukaran lipid. Hal ini memungkinkan terjadinya disintegrasi atau disrupsi membran liposom sehingga obat keluar sebelum mencapai sasaran.^{6,7} Interaksi dengan opsonin, yaitu makromolekul petanda partikel asing, menyebabkan pembersihan (*clearance*) liposom dari sirkulasi oleh makrofag. Makrofag banyak terdapat pada hepar, limpa, usus, paru-paru, kulit, atau dapat bersirkulasi dalam

darah sebagai monosit. Tempat-tempat ini disebut juga sistem retikuloendotelial (*reticuloendothelial system/RES*). Karena adanya interaksi dengan opsonin, setelah diinjeksi dalam aliran darah liposom akan diambil dalam jumlah besar oleh organ-organ yang kaya RES ini, terutama oleh hepar.^{3,6} Hal ini menyebabkan liposom sangat baik digunakan sebagai pembawa obat dalam terapi penyakit intraseluler makrofag, seperti leishmania, infeksi jamur, dan juga penyakit-penyakit yang berhubungan dengan hepar dan jaringan paru-paru.³

Laju dan derajat pengambilan liposom oleh organ dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti ukuran dan komposisi membran liposom. Liposom yang berukuran sangat kecil dapat melarikan diri dari pembersihan (*clearance*) oleh makrofag, sehingga ketika liposom kecil sampai ke hepar, proporsi ambilan liposom oleh hepatosit (sel parenkim hepar) lebih tinggi dibandingkan dengan ambilan oleh sel Kupffer (makrofag dalam hepar). Hal ini juga disebabkan liposom berukuran kecil dapat melewati sinusoid hepar dan dengan cepat berinteraksi dengan hepatosit. Liposom dengan ukuran yang lebih besar memiliki akses ke hepatosit yang terbatas karena tidak dapat melewati fenestrae sinusoid hati dengan rata-rata diameter 0,1 μm . Sementara itu, liposom yang berukuran sangat besar (> 7-10 μm) tersaring di dalam kapiler yang pertama kali ditemui, yang seringkali terjadi di paru-paru. Pengambilan ini diperkuat oleh inkorporasi lipid bermuatan negatif pada membran liposom. Contoh pengaruh komposisi membran terhadap ambilan organ antara lain adanya *lactosyl ceramide* pada liposom meningkatkan ambilan liposom berukuran kecil oleh hepar dan ambilan secara keseluruhan.^{3,6}

Nasib liposom yang diinjeksikan secara subkutan, intramuskular, atau intraperitoneal sama dengan yang diinjeksi secara intravena karena liposom akan keluar dari tempat injeksi menuju sirkulasi darah melalui sistem limfatik.⁶ Liposom yang diberikan secara subkutan dan intramuskular pada mulanya akan tertahan di tempat injeksi dan secara perlahan akan masuk sistem limfatik dan menuju nodus limfe, dimana liposom tersebut diambil oleh makrofag dan sebagian lainnya akan berinteraksi secara langsung dengan limfosit. Liposom yang diinjeksi di peritoneal akan diambil dalam jumlah besar oleh makrofag yang berada di rongga tersebut dan sebagian dapat masuk ke sirkulasi sistemik.^{2,3}

Target alami liposom ke organ-organ yang kaya akan RES mengurangi penyampaian liposom ke organ lain. Lokalisasi spesifik pemberian liposom pada organ tertentu dapat dilakukan dengan menambahkan molekul spesifik yang terikat pada membran liposom.⁸ Protein ligan atau molekul-molekul antibodi yang berada di permukaan sel dapat diinkorporasi ke dalam permukaan liposom. Ligan ini diharapkan dapat bereaksi dengan reseptor spesifik di permukaan sel populasi tertentu pada organ yang dituju.^{2,3,8} Cara ini telah terbukti keberhasilannya.³

Agar dapat digunakan sebagai pembawa obat yang efisien, liposom harus memiliki stabilitas biologik secara *in vivo*. Yang termasuk kestabilan biologik antara lain kontrol terhadap laju bersihan liposom dari sistem sirkulasi atau dari kompartemen tubuh jika obat diberikan secara lokal. Liposom dengan laju bersihan darah yang terlalu cepat kurang efektif untuk dapat digunakan sebagai pembawa obat.⁷ Laju bersihan darah liposom bergantung pada dosis, dan seperti yang telah dijelaskan di atas, dipengaruhi ukuran dan muatan permukaan liposom.⁷ Bersihan darah akan meningkat berbanding langsung dengan besarnya liposom.⁶ Bersihan darah akan menurun atau lebih lambat pada liposom yang tidak bermuatan atau netral. Penurunan bersihan darah juga terjadi bila lipid diberikan dalam dosis tinggi, yang menyebabkan saturasi (kejenuhan) dalam mekanisme ambilan oleh sistem fagositik mononuklear.⁸

Selain itu yang termasuk stabilitas biologi adalah terjaganya obat dalam pembawa obat sampai ke organ atau sel sasaran. Di atas telah dijelaskan bahwa interaksi liposom dengan lipoprotein dapat menyebabkan disrupsi liposom sehingga obat keluar sebelum mencapai sasaran.^{6,7} Penambahan molekul tertentu pada membran liposom, misalnya molekul *Polyethylene Glycol* (PEG) yang membentuk semacam bendera pada permukaan membran liposom, dapat mencegah masuknya komponen lipoprotein plasma yang dapat merusak membran liposom.⁸ Selain itu liposom juga harus dapat melepaskan obat yang dibawanya saat mencapai tujuan.⁷

Liposom yang terikat pada membran sel sasaran selanjutnya akan mengalami degradasi akibat aktivitas fosfolipase, protease, penurunan pH, ataupun dicerna oleh beberapa makrofag setelah obat dilepaskan ke dalam sel

melalui sistem difusi dan permeasi. Kecepatan disintegrasi liposom tergantung pada komposisinya.⁸

2.4. Tetraeter Lipid

Tetraeter Lipid (TEL) merupakan salah satu produk hasil ekstraksi dari Archaea yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum* atau *Sulfolobus acidocaldarius*.^{14,15} TEL dari *Thermoplasma acidophilum* telah teruji tidak toksik dan tidak bersifat mutagenik atau antimutagenik pada uji toksisitas akut, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*,¹⁷ sedangkan TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* belum teruji toksisitasnya.⁸

Lipid hasil ekstraksi membran dari Archaea ini berbeda bila dibandingkan dengan fosfolipid pada membran sel lain. Fosfolipid tersebut berupa eter-gliserol (bukan ester gliserol), tanpa ikatan rangkap dan memiliki gugus metil samping. Ikatan eter-gliserol sangat resisten terhadap hidrolisis pada pH rendah, sehingga memberi keuntungan dibandingkan ikatan ester.¹⁸⁻²⁰ Selain itu, ketiadaan ikatan rangkap dalam struktur TEL akan meningkatkan resistensi terhadap oksidasi, sedangkan adanya gugus metil samping akan menambah efek fluiditas. Karena itu, liposom yang dibentuk dari TEL dari Archaea tersebut bersifat stabil dengan ikatan yang cukup erat.²⁰

Hingga saat ini belum ada satupun bukti mengenai mekanisme interaksi TEL dengan membran sel hidup. Hasil penelitian sementara secara *in vitro* menunjukkan interaksi TEL dengan membran sel adalah fusi membran, transfer intermembran, dan endositosis. Degradasi TEL di dalam sel pun sampai saat ini belum dapat dijelaskan dengan baik karena produk standar hasil degradasi TEL belum tersedia.²⁰

Ukuran partikel liposom TEL, terutama dari *T.acidophilum* bervariasi tergantung cara pembuatannya. Liposom yang dibuat dengan cara pengocokan menggunakan tangan (*hand shaken*) ukurannya sangat besar hingga mencapai 7500 nm. Liposom ini dapat diperkecil dengan cara (1) sonifikasi, menghasilkan liposom berukuran sekitar 600 nm, (2) dialisis dengan detergen, membentuk liposom berukuran sekitar 370-450 nm, dan (3) ekstrusi melalui membran polikarbonat berpori 200 nm sehingga ukuran liposom menjadi 200 nm.²⁰

Pada beberapa penelitian tentang kombinasi TEL *Thermoplasma acidophilum* dan EPC dibuktikan bahwa liposom hasil kombinasi tersebut, baik pada rasio 25:75 ataupun 50:50, akan menambah muatan negatif pada permukaan membran liposom sehingga liposom tetap stabil dalam penyimpanan.⁸ Sebagai perbandingan, liposom yang terbuat dari EPC saja hanya stabil dalam satu hingga beberapa minggu di dalam kulkas (4-8° C), dan hanya beberapa hari dalam suhu yang lebih tinggi. Sementara itu liposom yang terbuat dari campuran TEL dan EPC dengan perbandingan 25:75 dan 50:50 stabil dalam kulkas hingga 622 hari.²⁰

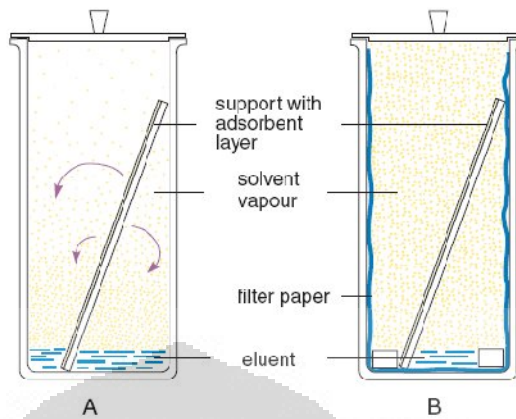
2.5. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi digunakan untuk memisahkan campuran substansi ke dalam komponen-komponen pembentuknya. Seluruh jenis kromatografi bekerja dengan prinsip yang sama. Seluruh jenis kromatografi memiliki fase diam berupa benda padat maupun cair yang diletakkan pada benda padat dan fase gerak berupa benda cair atau gas.¹⁶

Kromatografi lapis tipis (KLT) atau *Thin Layer Chromatography* (TLC) adalah salah satu jenis kromatografi yang menggunakan fase diam hidrofilik antara lain berupa gel silika atau alumina yang dilekatkan pada matriks yang cocok dan dilapiskan secara tipis pada permukaan plat (*plate*) plastik atau gelas. Fase gerak atau eluen dapat berupa suatu cairan atau campuran beberapa cairan yang sesuai. Eluen dapat bergerak secara horizontal atau vertikal berdasarkan sistem kapilaritas.^{3,16}

2.5.1. Teknik Kromatografi Lapis Tipis

Dekat dengan dasar plat, sebuah garis digambar menggunakan pensil dan tetesan kecil larutan campuran yang akan dipisahkan diletakkan di atasnya. Ketika bercak larutan kering, plat diletakkan pada wadah berisi eluen. Tinggi eluen harus di bawah bercak larutan. Wadah yang digunakan harus tersaturasi (dijenuhkan) dengan eluen agar eluen yang bergerak naik tidak menguap. Untuk itu, bagian dalam wadah dapat dilapisi dengan kertas saring yang telah dibasahi dengan eluen.

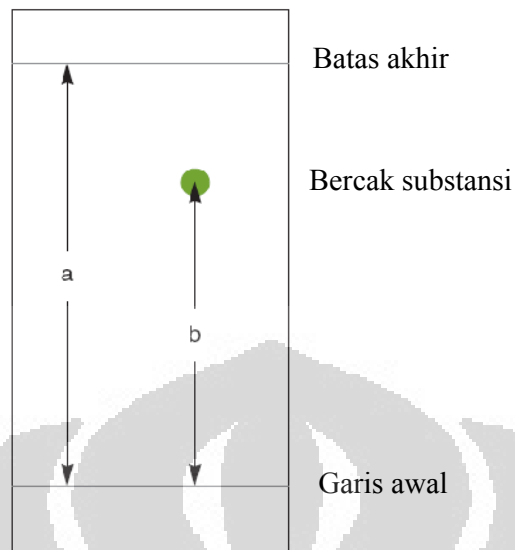


Gambar 5. Penjenuhan wadah dengan eluen. A: Wadah dengan saturasi normal. Tanda panah menunjukkan evaporasi eluen dari plate dan tanda titik menyimbolkan kejenuhan. B: wadah dengan kertas saring, jenuh dengan eluen.²¹

Eluen yang bergerak naik akan memisahkan komponen-komponen larutan yang berbeda pada laju yang berbeda sehingga memisahkan campuran tersebut menjadi beberapa bercak. Eluen dibiarkan naik hingga hampir mencapai ujung atas plat sehingga didapatkan pemisahan substansi yang maksimal. Setelah itu plat dikeluarkan dari wadah dan posisi bercak yang terbentuk ditandai dengan garis sebelum menguap. Jika bercak yang ingin dilihat tidak berwarna, visualisasi dapat dilakukan dengan menambahkan substansi yang dapat berfluoresensi ketika diberikan sinar UV, atau diberikan bahan kimia tertentu yang jika bereaksi dengan bercak akan menghasilkan produk yang berwarna.¹⁶

Jika yang ingin diketahui hanya jumlah substansi yang menyusun suatu campuran, maka prosedur berhenti sampai di sini. Namun jika tujuan dilakukannya kromatografi adalah untuk membantu identifikasi substansi penyusun, maka perlu dilakukan pengukuran nilai *Retention factor (Rf)* masing-masing bercak. Nilai *Rf* diketahui dengan menggunakan formulasi berikut:¹⁶

$$Rf = \frac{\text{Jarak tempuh substansi}}{\text{Jarak tempuh eluen}}$$



Gambar 6. Skema plat KLT. *Retention factor* = $b:a$.²¹

Jika percobaan ini diulang dalam kondisi yang persis sama, maka nilai R_f tiap substansi akan selalu sama. Namun jika kondisi berubah, misalnya suhu atau komposisi eluen, hal ini tidak berlaku.¹⁶

Jika terdapat kontrol substansi yang diketahui, identifikasi dapat dilakukan dengan membandingkan bercak dengan kontrol yang dijalankan pada piringan yang sama.¹⁶

2.5.2. Prinsip kerja

Gel silika dibuat dari silikon dioksida (silika). Atom-atom silikon dihubungkan dengan atom oksigen dengan struktur kovalen. Pada permukaan gel silika, atom silikon diikat dengan gugus $-OH$ sehingga pada permukaan gel silika terdapat ikatan $Si-O-H$, bukan $Si-O-Si$. Dengan adanya gugus $-OH$, permukaan gel silika bersifat sangat polar dan dapat membentuk ikatan hidrogen, van der Waals dan momen dipol dengan substansi yang sesuai di sekitarnya. Bahan lain yang sering digunakan sebagai fase diam adalah alumina (aluminium hidroksida). Atom aluminium pada permukaannya juga diikat dengan gugus $-OH$ sehingga sifatnya sama dengan gel silika.¹⁶

Saat eluen bergerak naik pada plat, eluen melarutkan bahan campuran yang diletakkan pada garis dasar. Substansi-substansi pembentuk bahan campuran

tersebut ikut bergerak naik seiring dengan naiknya eluen. Kecepatan substansi bergerak naik tergantung pada dua hal, yaitu (1) kelarutan substansi dalam eluen, dan (2) kekuatan substansi menempel pada fase diam. Kedua hal ini ditentukan oleh besarnya ketertarikan substansi pada fase diam dan fase gerak.¹⁶

Substansi yang dapat membentuk ikatan hidrogen akan terikat (diadsorpsi) lebih kuat pada gel silika dibandingkan dengan substansi lain yang membentuk ikatan van der Waals yang lebih lemah. Adsorpsi ini tidak permanen. Terdapat gerakan molekul yang konstan antara adsorpsi pada gel silika dan kembali larut dengan eluen. Substansi hanya dapat bergerak naik saat terlarut dalam eluen. Saat diadsorpsi oleh gel silika, gerakan substansi sementara berhenti sedangkan eluen tetap bergerak naik tanpa membawa substansi. Dengan kata lain, semakin kuat substansi diadsorpsi, semakin dekat jarak tempuhnya pada plate.¹⁶

Sangat jarang ditemukan kedua substansi yang dapat membentuk ikatan hidrogen berhenti pada jarak yang persis sama karena tarik-menarik antara substansi dengan eluen juga berperan penting. Hal ini menentukan seberapa mudah substansi ditarik kembali ke eluen setelah diadsorpsi oleh permukaan silika. Namun pemisahan yang kurang baik antara dua substansi dapat terjadi. Pada kasus demikian, perubahan eluen dapat membantu memisahkan kedua substansi, termasuk perubahan pH eluen.¹⁶ Pada fase gerak dapat ditambahkan kloroform atau air untuk menambah atau mengurangi sifat hidrofiliknya. Untuk KLT fosfolipid biasanya pada fase gerak ditambahkan kloroform.³

2.5.3. Kromatografi Lapis Tipis pada Lipid

Pada KLT fosfolipid, fase diam yang paling umum digunakan adalah gel silika. Pada fase gerak biasanya ditambahkan kloroform.³ Pada KLT fosfolipid, lipid yang berbeda akan menyebar dan menetap di daerah yang berbeda pada gel seiring dengan berjalannya fasa gerak melalui fasa solid. Lipid dapat divisualisasikan menggunakan pewarnaan spesifik yang disebarkan pada permukaan piring atau melalui metode non-spesifik dengan pemberian yodium. Jika lipid dapat menyerap UV, maka visualisasinya dilakukan pada fasa diam yang mengandung materi fluoresen tanpa pewarnaan. Dengan demikian ketika diiluminasi dengan sinar UV bercak akan terlihat terang pada latar yang gelap.³

KLT juga dapat memberi informasi mengenai kemurnian dan konsentrasi lipid. Lipid murni akan meninggalkan titik tunggal pada fasa diam. Fosfolipid yang telah mengalami degradasi, akan terlihat banyak titik dengan Rf yang berbeda-beda dibandingkan dengan fosfolipid yang belum mengalami degradasi yang akan terlihat sebagai satu titik.³

2.6. Mencit C3H

Mencit C3H merupakan hasil kawin silang antara Bagg albino dengan galur DBA yang dilakukan oleh L.C. Strong. Mencit yang dibudidayakan sejak tahun 1960 oleh bagian Patologi Anatomi FKUI ini telah menghasilkan *breeding* ratusan kali. Mencit ini umumnya digunakan pada penelitian tumor atau kanker. Dalam keadaan normal, dengan pemberian makanan standar, minum secukupnya, serta vitamin, mencit berumur 12-16 minggu mempunyai berat badan sekitar 18-24 gram dengan berat hepar rata-rata 900 mg.⁷

Cara mematikan mencit menurut persyaratan etika biomedik adalah dengan meletakkan mencit ke dalam wadah khusus di luar kandang pemeliharaan, umumnya dialasi dengan kapas atau tisu agar mudah dibasahi dengan kloroform atau eter. Apabila mencit harus dimatikan di dalam kandang pemeliharaan, penggunaan kloroform atau eter tidak boleh dilakukan dan harus menggunakan karbon dioksida. Jumlah hewan per wadah dianjurkan secukupnya agar tidak saling melukai sebelum mati.⁸

2.7. Injeksi Intra-peritoneal pada Mencit

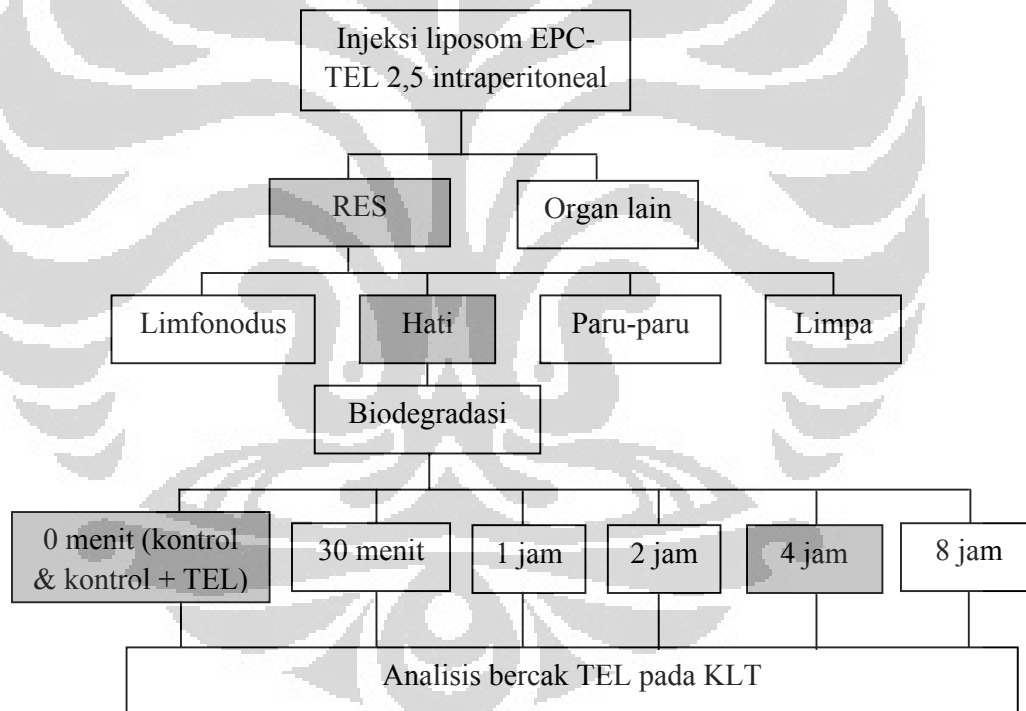
Cara pemberian yang paling sering digunakan untuk administrasi larutan atau suspensi pada mencit adalah injeksi subkutan, intra-peritoneal, atau intravena. Pemberian intra-peritoneal adalah rute yang paling umum digunakan karena tekniknya yang mudah. Besarnya luas permukaan rongga peritoneal dan banyaknya *supply* darah memungkinkan laju absorpsi yang cepat. Laju absorpsi rute ini biasanya setengah atau seperempat kali kecepatan absorpsi intravena.²²

Keterbatasan injeksi intra-peritoneal adalah sensitivitas jaringan terhadap substansi yang dapat mengiritasi dan kurangnya toleransi terhadap larutan dengan

pH non-fisiologis. Larutan harus isotonis dan volume cairan yang cukup banyak dapat dimasukkan secara intraperitoneal.²²

Mencit biasanya dipegang dengan posisi supinasi dengan ujung posteriornya sedikit ditinggikan, atau kepala diturunkan sedikit lebih rendah dari badannya. Jarum dan *syringe* harus dijaga agar hampir paralel dengan kolumna vertebralis untuk menghindari penetrasi organ viscera. Jarum dimasukkan dengan sudut 10° antara jarum dengan permukaan abdomen pada quadran bawah abdomen. Maksimal volume larutan yang dimasukkan secara intraperitoneal adalah 3 mL dan ukuran jarum yang direkomendasikan adalah <23 G.²²

2.8. Kerangka Konsep



Gambar 7. Kerangka konsep penelitian

BAB III

METODOLOGI

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian studi eksperimental untuk mengetahui degradasi TEL dari *Thermoplasma acidophilum* dalam liposom EPC-TEL 2,5 secara *in vivo* pada hepar mencit.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Departemen Farmasi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia sejak bulan Maret 2007 hingga Maret 2008 dengan perincian terlampir (Lampiran 1).

3.3. Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah mencit galur C3H jantan dan betina hasil *breeding* di Departemen Patologi Anatomi FKUI.

3.4. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel yang digunakan adalah mencit galur C3H berusia 12-16 minggu dengan berat 18-24 g.

3.5. Besar Sampel

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian induk mengenai uji degradasi *in vivo* TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 yang dilakukan oleh lima orang peneliti. Untuk mengetahui degradasi TEL secara kontinu, maka dalam penelitian tersebut degradasi TEL diukur dalam lima interval waktu yang berbeda, yaitu 30 menit, 1 jam, 2 jam, 4 jam, dan 8 jam setelah injeksi liposom. Ditambah dengan 1 kelompok kontrol, maka jumlah kelompok dalam penelitian induk adalah 6, yaitu:

1. Kelompok kontrol: tidak mendapat liposom.
2. Kelompok perlakuan 1: uji degradasi TEL oleh hepar dilakukan dalam waktu 30 menit setelah penyuntikan liposom intraperitoneal.

3. Kelompok perlakuan 2: uji degradasi TEL oleh hepar dilakukan dalam waktu 1 jam setelah penyuntikan liposom intraperitoneal.
4. Kelompok perlakuan 3: uji degradasi TEL oleh hepar dilakukan dalam waktu 2 jam setelah penyuntikan liposom intraperitoneal.
5. Kelompok perlakuan 4: uji degradasi TEL oleh hepar dilakukan dalam waktu 4 jam setelah penyuntikan liposom intraperitoneal.
6. Kelompok perlakuan 5: uji degradasi TEL oleh hepar dilakukan dalam waktu 8 jam setelah penyuntikan liposom intraperitoneal.

Jumlah sampel dalam penelitian ini dihitung berdasarkan jumlah kelompok dalam penelitian induk. Karena terdapat 6 kelompok, maka berdasarkan rumus Federer jumlah sampel minimal adalah:

Rumus Federer: $(n-1)(t-1) \geq 15$

Keterangan:

n = jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t = jumlah kelompok perlakuan

t = 6, maka didapatkan:

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$(n-1)5 \geq 15$$

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

$$n \geq 4$$

minimal jumlah sampel = 4

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, jumlah sampel mencit yang digunakan pada penelitian ini adalah 4 ekor per kelompok. Karena jumlah kelompok adalah 6, maka jumlah mencit seluruhnya adalah 24 ekor.

Dalam penelitian ini, penulis hanya menganalisis dan membahas degradasi TEL pada 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 4 jam (selanjutnya disebut kelompok perlakuan). Dengan demikian jumlah hewan yang digunakan adalah 8 ekor, dibagi dalam 2 kelompok dengan masing-masing 4 ekor per kelompok yang dipilih secara acak.

3.6. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Labu berukuran 250 mL
- *Rotavapor-vacuum pump-waterbath* Büchi
- Set bedah minor
- Alat sentrifugasi Sorvall Biofuge Primo
- Pipet
- *Micropipette* Socorex
- Timbangan gram
- Timbangan miligram
- Timbangan mikrogram Mettler AE 200
- *Homogenizer* Lurex
- Plat KLT yang terbuat dari gel silika (*TLC sheet silica gel 60 F254* Merck)
- *Microliter Syringes* Hamilton
- *Chamber* atau wadah
- Kertas saring Whatman
- *Scanner*
- *Hairdryer*
- Oven

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Delapan ekor mencit galur C3H jantan dan betina sebagai hewan coba.
- Liposom EPC-TEL 2,5. TEL dari *Thermoplasma acidophilum* diperoleh dari IFB Halle, Jerman. EPC didapatkan dari Lipoid®.
- Kloroform
- Etanol
- larutan *Dapar* PBS
- Metanol
- Etil asetat
- NaOH 0,01M
- Eter
- Larutan NaCl 0,9%
- Tembaga asetat 3% dan asam fosfat 8%
- Gas N₂

3.7. Cara Kerja

Langkah-langkah kerja yang dilakukan dalam penelitian ini terdiri dari (1) pembuatan liposom, (2) penyuntikan liposom pada mencit, (3) ekstraksi hepar mencit, (4) aplikasi kalibrasi dan ekstraksi hepar mencit pada kromatografi lapis tipis, dan (5) analisis hasil kromatografi.

Seluruh langkah penelitian ini dilakukan dalam 4 tahap pengulangan yang dilakukan pada waktu yang berbeda. Pada setiap pengulangan dilakukan uji terhadap 2 sampel, yaitu 1 mencit kelompok kontrol dan 1 mencit kelompok perlakuan.

Dengan pertimbangan efisiensi waktu dan alat, beberapa langkah kerja dalam penelitian ini dilakukan bersamaan dengan peneliti lain yang tergabung dalam penelitian induk mengenai uji degradasi TEL *in vivo*. Langkah kerja yang dilakukan bersama adalah pembuatan liposom dan kromatografi lapis tipis.

3.7.1. Pembuatan Liposom

Pembuatan liposom dilakukan bersama dengan peneliti lain yang tergabung dalam penelitian induk. Pembuatan liposom dilakukan setiap kali memulai setiap

gelombang untuk menghindari kerusakan pada penyimpanan. Preparasi liposom EPC-TEL 2,5 dilakukan menurut metode yang dikembangkan oleh Purwaningsih:^{8,23-25}

1. Labu berukuran 250 mL disiapkan, dicuci dengan air tanpa sabun berulang kali, setelah itu dibilas dengan ethanol tehnis dan dikeringkan.
2. Perbandingan EPC: TEL dihitung. Untuk mendapatkan liposom EPC-TEL 2,5 mol %, maka perbandingan mol EPC:TEL adalah 40:1. Perbandingan mol EPC:TEL yang dipakai dalam penelitian ini adalah 4 mmol:0,1 mmol.
3. EPC 4 mmol dan TEL 0,1 mmol disiapkan sesuai dengan kebutuhan pada tiap gelombang. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 2.
4. EPC dan TEL dimasukkan ke dalam labu sesuai perhitungan bersama dengan *beads* dan campuran kloroform etanol 1:1 sebanyak 10 mL.
5. Labu diputar dengan Rotavapor Büchi:
 - Mula-mula dengan kecepatan rendah dan tekanan 200 mBar.
 - Setelah volume yang tersisa dalam labu menjadi setengah volume awal, kecepatan ditingkatkan.
 - Ketika cairan sudah mulai kering, tekanan diturunkan bertahap sampai 30-40 mBar dan dibiarkan selama \pm 1 jam.
 - Saat *beads* sudah tidak bergerak, labu dibiarkan berputar selama 1-2 jam.
 - Setelah liposom kering, rotavapor dimatikan. Sebelum dimatikan tekanan dinaikkan sampai 960 mBar, kecepatan diturunkan, kemudian dimatikan.
6. Larutan dapar PBS dengan pH 7,4 disiapkan sesuai kebutuhan pada tiap gelombang. PBS yang dibutuhkan yaitu 0,5 mL untuk tiap mencit.
7. Larutan PBS dimasukkan ke dalam tabung untuk melarutkan liposom.

3.7.2. Penyuntikan Liposom pada Mencit dan Pengambilan Hepar

1. Untuk menentukan sampel tiap kelompok, mencit diambil secara acak dan diberi nomor pada telinganya untuk kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 4 jam.
2. Berat tiap mencit ditimbang dan dicatat. Berat mencit dapat dilihat pada lampiran 3.

3. Pada kelompok perlakuan, tiap mencit diinjeksikan 0,5 mL Liposom EPC-TEL 2,5 secara intraperitoneal. Waktu penyuntikan dicatat.
4. Pada kelompok kontrol, tiap mencit disuntikkan 0,5 mL larutan NaCl fisiologis secara intraperitoneal.
5. Mencit dimatikan sesuai dengan kelompok masing-masing. Mencit kelompok kontrol dimatikan segera setelah penyuntikan larutan fisiologis, sedangkan mencit kelompok perlakuan dimatikan 4 jam setelah penyuntikan. Prosedur mematikan mencit dilakukan dengan memenuhi persyaratan etika biomedik. Mencit diletakkan ke dalam wadah khusus di luar kandang pemeliharaan. Wadah dialasi dengan kapas yang dibasahi eter. Jumlah mencit per wadah adalah satu agar tidak saling melukai sebelum mati.
6. Hepar tiap mencit diambil dengan pembedahan dalam waktu kurang dari 10 menit. Selama pembedahan organ mencit diteteskan NaCl 0,9 % secukupnya, terutama pada hepar agar jaringan tidak mati.
7. Hepar tiap mencit ditimbang. Data berat mencit dan hepar mencit pada masing-masing kelompok terlampir (lampiran 3).
8. Dari tiap mencit kelompok perlakuan diambil 200 mg hepar yang ditimbang menggunakan timbangan miligram. Sementara itu dari tiap mencit kelompok kontrol diambil 2 potongan hepar masing-masing dengan berat 200 mg, yang kemudian dibagi menjadi 2 jenis kontrol, yaitu kontrol tanpa TEL dan kontrol yang akan ditambahkan liposom EPC-TEL 2,5 secara *in vitro* saat proses homogenisasi (selanjutnya disebut kontrol+TEL). Potongan hepar dikemas dalam alumunium foil lalu disimpan dalam wadah berisi *dry ice* dan dimasukkan ke dalam *freezer*.

3.7.3. Ekstraksi hepar

Ekstraksi hepar dilakukan menurut metode ekstraksi organ oleh Jonung dan kawan-kawan.⁸

1. Seluruh sampel hepar dihomogenasi dengan homogenizer Lurex® secara manual. Pada hepar kelompok kontrol+TEL, sebanyak 0,5 mL liposom EPC-TEL 2,5 ditambahkan secara *in vitro* saat proses homogenisasi.

2. Methanol 2 mL disiapkan, kemudian diteteskan sedikit demi sedikit ke dalam homogenizer selama proses homogenasi.
3. Hepar yang telah terhomogenasi disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.
4. Supernatan dan residu dari hasil sentrifugasi tersebut dipisahkan. Masing-masing dimasukkan ke dalam tabung kimia, kemudian diberi label supernatan I dan residu I.
5. Residu I dari sentrifugasi yang pertama dihomogenasi.
6. Methanol 2 mL disiapkan dan diteteskan sedikit demi sedikit ke dalam homogenizer selama proses homogenasi residu I.
7. Residu I disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.
8. Supernatan dan residu yang terbentuk dipisahkan dan dimasukkan ke dalam tabung. Masing-masing tabung diberi label supernatan II dan residu II.
9. Supernatan I dan II dicampurkan, kemudian dikeringkan dengan gas N₂. Hasil pengeringan kemudian disebut residu III.
10. Residu III dilarutkan dengan 1,5 mL etil asetat dan 0,5 NaOH 0,01 M. hasil pelarutan disebut supernatan III.
11. Supernatan III disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.
12. Supernatan dan residu yang terbentuk dipisahkan dan dimasukkan ke dalam tabung. Masing-masing tabung diberi label supernatan IV dan residu IV.
13. Supernatan IV dan residu IV dikeringkan dengan gas N₂. Hasil pengeringan disebut supernatan V dan residu V.

3.7.4. Persiapan Kalibrasi

1. Pada awalnya, kalibrasi dibuat dengan menggunakan TEL dengan kadar 75 µg, 150 µg, dan 300 µg. Sebelum penelitian ini dilakukan, dilakukan sebuah pengujian pendahuluan. Pada pengujian, TEL dengan ketiga konsentrasi tersebut dirunning pada plat KLT. Hasil pengujian menunjukkan bercak TEL tidak terlihat dengan jelas. Agar bercak yang dihasilkan dapat lebih baik, kadar TEL dinaikkan menjadi 100, 200, dan 300 µg.
2. Persiapan TEL dengan kadar 100, 200, dan 300 µg.

Setelah dijalankan pada plat KLT, bercak TEL 100 μg masih kurang terlihat dengan jelas. Oleh karena itu kadar TEL yang digunakan sebagai kalibrasi dalam penelitian ini adalah 200, 300, dan 400 μg .

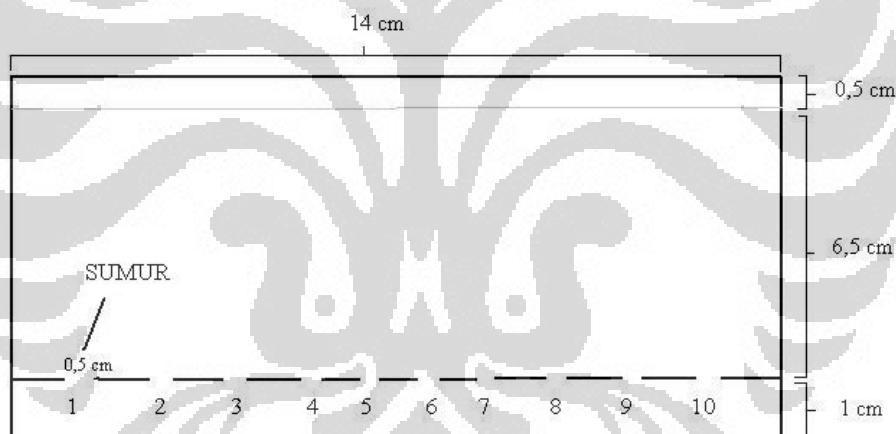
3. Persiapan TEL dengan konsentrasi 200, 300, dan 400 μg .

Perhitungan kalibrasi dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.7.5. Kromatografi lapis tipis

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, tahap ini dilakukan bersama dengan semua kelompok pada penelitian induk agar degadasi TEL pada hepar mencit dapat diamati secara kontinu.

1. Plat KLT yang terbuat dari gel silika disiapkan dengan ukuran seperti dibawah:



Gambar 8: Skema plat KLT yang digunakan dalam penelitian

Keterangan:

- a. Sumur 1 : Kalibrasi 75 ug
- b. Sumur 2 : Kalibrasi 150 ug
- c. Sumur 3 : Kalibrasi 300 ug
- d. Sumur 4 : Kontrol
- e. Sumur 5 : Kontrol + TEL
- f. Sumur 6 : Perlakuan 30 menit

- g. Sumur 7 : Perlakuan 60 menit
 - h. Sumur 8 : Perlakuan 2 jam
 - i. Sumur 9 : Perlakuan 4 jam
 - j. Sumur 10 : Perlakuan 8 jam
2. Plat KLT dikeringkan dengan aliran udara panas (*hairdryer*).
 3. Kalibrasi diaplikasikan pada sumur yang telah ditentukan dengan menggunakan *Microliter Syringe* Hamilton.
 4. Supernatan hepar kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang telah dikeringkan dengan N₂ dilarutkan dengan 300 µl kloroform:metanol dengan perbandingan 2:1.
 5. Setelah dilarutkan, dari tiap kelompok diambil 20 µl larutan supernatan dan diaplikasikan dalam sumur yang sesuai pada plat KLT menggunakan *Microliter Syringes* Hamilton.
 6. Wadah atau *chamber* dan tutup dengan ukuran yang sesuai disiapkan.
 7. Merujuk pada penelitian pendahuluan mengenai liposom EPC-TEL 2,5 oleh Puwaningsih, pada awalnya eluen yang digunakan sebagai fase gerak pada penelitian ini adalah kloroform etanol dengan perbandingan 9 : 1. Namun pada pengujian yang dilakukan sebelum penelitian didapatkan bahwa dengan perbandingan eluen 9:1, bercak lipid bergerak naik terlalu cepat sehingga hampir melewati garis batas atas. Untuk mengatasinya, perbandingan eluen dirubah menjadi kloroform:etanol 6:4.
 8. Kertas saring dimasukkan ke dalam wadah dengan posisi diatur sedemikian rupa agar melapisi alas dan dinding wadah.
 9. Eluen dimasukkan ke dalam wadah. Kemudian wadah ditutup dan tunggu hingga kertas saring menjadi jenuh agar eluen tidak menguap saat bergerak naik.¹⁶
 10. Plat KLT dimasukkan ke dalam wadah dengan hati-hati agar supernatan yang diaplikasikan tidak tercelup ke dalam eluen.
 11. Wadah ditutup dengan rapat dan pergerakan eluen pada plat KLT diamati dengan seksama.
 12. Ketika eluen telah mencapai garis akhir yang ditentukan, plat KLT diangkat kemudian dikeringkan.

13. Setelah kering, plat KLT direndam ke dalam tembaga asetat 3% dan asam fosfat 8% sebagai pewarna selama 10 detik.
14. Setelah diberi pewarnaan, plat KLT dibiarkan kering pada suhu ruangan.
15. Setelah kering, plat KLT dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 180° C selama 10 menit. Berdasarkan penelitian sebelumnya mengenai liposom EPC-TEL 2,5 oleh Purwaningsih, bercak TEL tidak muncul sebelum dipanaskan 180° C.
16. Setelah bercak TEL terlihat, plat KLT dipindai dengan menggunakan scanner.
17. Gambar hasil *running* KLT yang diperoleh diolah menggunakan program adobe photoshop 7.0. Degradasi TEL setelah 4 jam dinilai dengan cara membandingkan bercak TEL pada kelompok perlakuan dengan bercak TEL pada kelompok kontrol+TEL, dengan asumsi TEL pada kelompok kontrol+TEL tidak terdegradasi. Bercak TEL dikenali dengan membandingkan bercak-bercak yang terbentuk pada kelompok kontrol, kontrol+TEL, dan perlakuan 4 jam. Suatu bercak diidentifikasi sebagai TEL jika bercak tersebut terdapat pada kelompok kontrol+TEL dan kelompok perlakuan, namun bercak pada *Rf* tersebut tidak ditemukan pada kelompok kontrol tanpa TEL. TEL dikatakan terdegradasi bila bercak TEL pada kelompok perlakuan mempunyai lebih banyak *Rf* dibandingkan dengan bercak TEL pada kelompok kontrol+TEL. TEL dikatakan tidak terdegradasi jika seluruh *Rf* TEL pada kelompok perlakuan sama dengan *Rf* TEL pada kelompok kontrol+TEL.

3.8. Definisi Operasional

Dalam penelitian ini, ada beberapa istilah yang harus dijelaskan secara eksplisit sehingga tidak menimbulkan salah persepsi dalam pemahamannya, antara lain:

- Biodegradasi: proses pemecahan substansi organik oleh enzim yang diproduksi organisme hidup.²⁶
- *In vivo*: di dalam tubuh hidup. Yang dimaksud *in vivo* dalam penelitian ini adalah degradasi TEL oleh hepar dilihat setelah liposom EPC-TEL 2,5

diinjeksikan ke dalam tubuh mencit yang hidup, bukan diinjeksikan ke dalam hepar mencit yang sudah dimatikan di dalam laboratorium.

- Tetraeter Lipid (TEL): suatu jenis lipid hasil ekstraksi membran dari Archaea.⁷ TEL yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari *Thermoplasma acidophilum*.
- Liposom EPC-TEL 2,5: Liposom yang dibuat dari kombinasi lesitin/fosfatidil kolin kuning telur (*Egg yolk Phosphatidil Choline/EPC*) dan TEL 2,5 mol %.
- Injeksi intraperitoneal: injeksi ke dalam rongga peritoneal.
- *Rf*: jarak bercak dari titik awal dibagi jarak titik awal ke batas akhir elusi pada plat KLT.
- TEL dianggap terdegradasi bila bercak TEL pada kelompok perlakuan mempunyai lebih banyak *Rf* dibandingkan dengan bercak TEL pada kelompok kontrol+TEL
- TEL dianggap tidak terdegradasi jika seluruh *Rf* TEL pada kelompok perlakuan sama dengan *Rf* TEL pada kelompok kontrol.

3.9. Identifikasi Variabel

Variabel bebas : durasi liposom EPC-TEL 2,5 pada mencit C3H.

Variabel terikat : terdegradasi atau tidaknya TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5.

Dalam menentukan variabel bebas, peneliti menggunakan skala nominal (nol menit, 4jam). Untuk mengukur variabel terikat, peneliti menggunakan skala nominal (terdegradasi atau tidak).

3.10. Analisis Data

Penelitian yang dilakukan membandingkan degradasi TEL dari dua kelompok, yaitu satu kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol+TEL.

Tabel 1. Langkah-langkah penentuan uji statistik dalam penelitian

	Langkah	Jawaban
1	Variabel yang dihubungkan	Variabel yang dihubungkan adalah durasi liposom pada mencit (nominal)

		dan terdegradasi atau tidaknya TEL (nominal)
2	Jenis hipotesis	Komparatif
3	Masalah skala variabel	Kategorik
4	Berpasangan / tidak berpasangan	Tidak berpasangan
5	Jenis tabel B x K	2 x 2
Kesimpulan: Jenis tabel pada penelitian ini adalah 2x2. Uji yang digunakan adalah uji <i>chi square</i> bila memenuhi syarat. Bila tidak memenuhi syarat uji <i>chi square</i> , maka dilakukan uji <i>fisher</i> .		

3.11. Masalah Etika

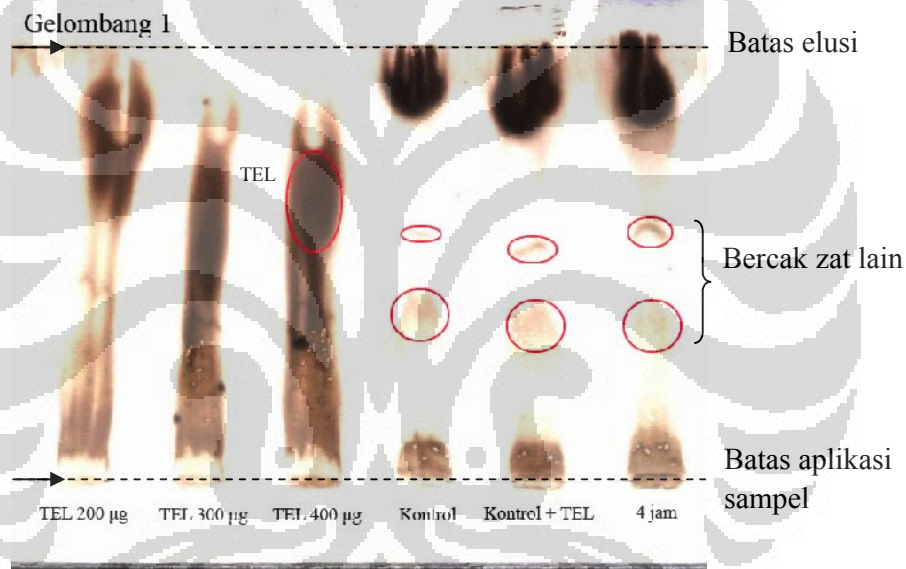
Sampai saat ini di FKUI belum ada komisi etik untuk penelitian dengan objek pada hewan. Yang sudah ada saat ini adalah komisi etik untuk penelitian dengan objek pada manusia. Dengan demikian surat persetujuan etik pada penelitian ini belum bisa didapatkan.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Degradasi TEL dinilai dengan menganalisis bercak TEL yang terbentuk pada plat KLT, yaitu dengan membandingkan bercak TEL pada kelompok perlakuan dengan bercak TEL pada kelompok kontrol+TEL, dengan asumsi TEL pada kelompok kontrol+TEL tidak terdegradasi.

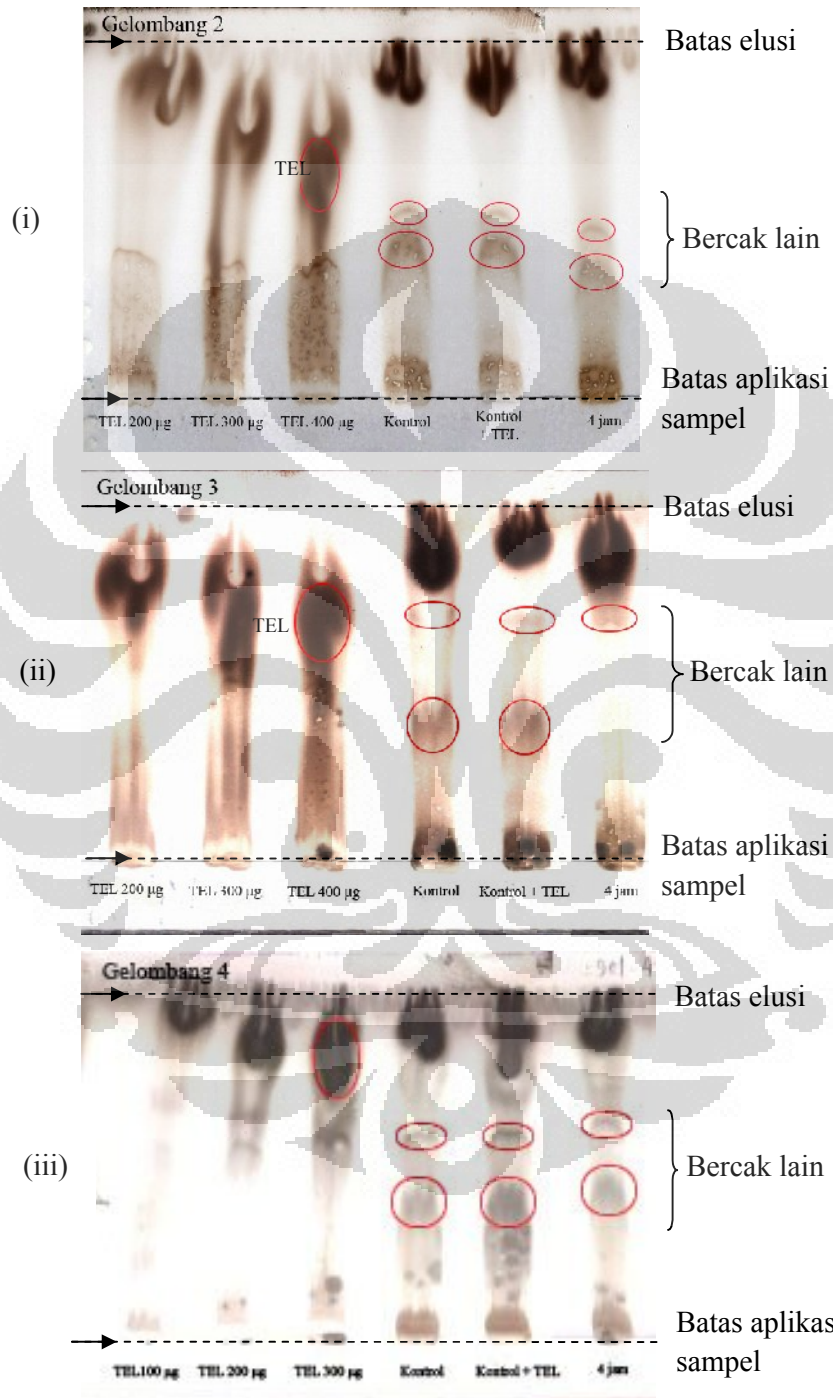
Hasil aplikasi supernatan hepar pada plat KLT dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Hasil KLT pada pengulangan pertama. (TEL 200 µg, 300 µg, 400 µg: TEL dengan kadar 200 µg, 300 µg, dan 400 µg sebagai kalibrasi; kontrol: supernatan hepar tanpa liposom; kontrol+TEL: supernatan hepar yang ditambahkan liposom EPC-TEL 2,5 secara *in vitro*; 4 jam: hepar kelompok perlakuan 4 jam).

Dari hasil KLT pada Gambar 9, terlihat bahwa letak bercak-bercak yang terbentuk pada kelompok kontrol+TEL dan kelompok perlakuan 4 jam relatif sama dengan bercak pada kelompok kontrol. Dengan demikian nilai *R_f* bercak-bercak itupun relatif sama. Hal ini menunjukkan bahwa bercak yang terbentuk pada kedua kelompok (kontrol+TEL dan perlakuan) bukan merupakan bercak

TEL. Bercak ini kemungkinan adalah zat lain yang berasal dari membran sel hepar. Gambaran yang sama terlihat pada pengulangan KLT ke-2 sampai 4 yang terlihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Hasil KLT pada pengulangan kedua (i), ketiga (ii), dan keempat (iii). (TEL 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg: TEL dengan kadar 100 µg, 200 µg, 300 µg,

dan 400 µg sebagai kalibrasi; kontrol: supernatan hepar tanpa liposom; kontrol+TEL: supernatan hepar yang ditambahkan liposom EPC-TEL secara *in vitro*; 4 jam: hepar kelompok perlakuan 4 jam).

Karena tidak ada bercak TEL yang terbentuk, maka degradasi TEL pada kelompok perlakuan 4 jam tidak dapat ditentukan dan diuji secara statistik.

4.2. Pembahasan

Liposom EPC-TEL 2,5 merupakan liposom yang sedang dikembangkan, yang dibuat dari kombinasi fosfatidil kolin kuning telur (*Egg yolk Phosphatidil Choline/EPC*) dan TEL 2,5 mol %. TEL dipilih sebagai penstabil membran karena TEL mempunyai struktur berupa 2 gugus kepala polar dengan tebal membran sekitar 4 nm, sehingga diharapkan akan dapat berinkorporasi dengan membran liposom EPC yang menyerupai pasak. Dengan demikian, stabilitas membran liposom diperkirakan dapat lebih baik dibandingkan penstabil membran lain. Pada penelitian ini, digunakan TEL dari *Thermoplasma acidophilum* karena telah banyak diteliti sebagai pembawa obat, terbukti tidak toksik, dan tidak bersifat mutagenik atau antimutagenik.¹⁷ Penggunaan TEL yang hanya 2,5 mol% lebih ditekankan pada segi keamanannya untuk jangka panjang karena hingga saat ini mekanisme pemecahan atau metabolisme TEL secara *in vivo* belum diketahui.^{8,20}

Salah satu syarat liposom agar dapat digunakan sebagai pembawa obat yang baik adalah dapat didegradasi di dalam tubuh.⁶ Liposom ini belum pernah diuji mengenai biodegradasinya, terutama apakah TEL dalam liposom ini dapat terdegradasi dalam tubuh. Dalam penelitian ini, pengujian degradasi dilakukan pada hepar 4 jam setelah injeksi intraperitoneal. Hal ini ditentukan berdasarkan hasil penelitian terdahulu oleh Purwaningsih mengenai distribusi metilprednisolon palmitat dalam liposom EPC-TEL 2,5 pada beberapa organ mencit. Pada penelitian tersebut, liposom EPC-TEL 2,5 yang menggunakan bahan TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* terbukti terdistribusi dengan baik di dalam tubuh mencit setelah pemberian secara intraperitoneal. Gambaran distribusi liposom ini tampak nyata dalam organ yang kaya akan sistem retikulum endoplasma. Distribusi terbesar adalah pada hepar, yang mulai tampak pada menit ke-30

setelah pemberian intraperitoneal, dan diikuti secara berurutan pada limpa, ginjal, timus, dan terendah pada sumsum tulang.²⁷ Karena distribusi yang paling besar adalah ke hepar dan metabolisme obat yang paling besar terjadi di hepar, maka uji degradasi TEL pada penelitian ini dilakukan pada hepar. Berdasarkan waktu munculnya liposom pada hepar, yaitu pada menit ke-30, maka diharapkan pada jam ke-4 liposom telah sampai ke hepar dan telah terdegradasi.

Cara pemberian larutan pada mencit dapat melalui injeksi subkutan, intraperitoneal, atau intravena. Pada penelitian ini pemberian liposom pada mencit dipilih dengan cara intraperitoneal, karena tekniknya yang mudah sehingga mengurangi kemungkinan kesalahan dalam penyuntikan. Selain itu besarnya luas permukaan rongga peritoneal dan banyaknya *supply* darah memungkinkan laju absorpsi yang cepat. Laju absorpsi rute ini biasanya setengah atau seperempat kali kecepatan absorpsi intravena.²²

Metode ekstraksi hepar dalam penelitian ini dilakukan berdasarkan metode ekstraksi organ oleh Jonung dan kawan-kawan karena metode ini merupakan metode yang paling sederhana, mudah dilakukan, dan tidak membutuhkan banyak waktu.⁸

Dalam penelitian ini digunakan KLT untuk menilai degradasi TEL oleh hepar 4 jam setelah injeksi liposom intraperitoneal. KLT dapat memberi informasi mengenai kemurnian dan konsentrasi lipid. Lipid yang telah mengalami degradasi akan menghasilkan banyak titik dengan Rf yang berbeda-beda, sedangkan lipid yang belum mengalami degradasi akan terlihat sebagai satu titik.³

Pada penelitian ini, penilaian degradasi dilakukan dengan membandingkan bercak TEL pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol+TEL, dengan asumsi TEL pada kelompok kontrol+TEL tidak terdegradasi. Selanjutnya data mengenai terdegradasi atau tidaknya TEL pada kelompok perlakuan dimasukkan sebagai variabel terikat pada uji hipotesis. Namun dari hasil KLT tidak ditemukan bercak TEL baik pada kelompok kontrol+TEL maupun pada kelompok perlakuan. Dengan demikian degradasi TEL pada hepar tidak dapat ditentukan, sehingga tidak dapat dilakukan uji hipotesis karena tidak tersedianya data untuk variabel terikat.

Tidak tampaknya bercak TEL kemungkinan besar disebabkan TEL pada kedua kelompok telah terdegradasi oleh enzim-enzim yang dimiliki hepar, namun produk degradasi TEL pada kedua kelompok tidak dapat dideteksi oleh KLT yang digunakan dalam penelitian ini. Pada kelompok perlakuan 4 jam, TEL kemungkinan sudah terdegradasi oleh enzim hepar secara *in vivo*. Sementara itu pada kelompok kontrol+TEL, TEL pada liposom EPC-TEL 2,5 yang ditambahkan secara *in vitro* pada hepar juga mengalami degradasi oleh enzim-enzim yang keluar dari hepatosit yang rusak saat homogenisasi.

Kemungkinan telah terdegradasinya TEL dipikirkan karena plat KLT yang digunakan dalam penelitian ini dapat memisahkan dan mendeteksi bahan-bahan yang belum diketahui sampai dengan konsentrasi 1-5 ng.²⁸ Pada kelompok kontrol + TEL, kadar TEL yang diberikan langsung pada hepar adalah 148,8 µg. Kemudian dari 300 µL larutan ekstraksi hepar yang telah diberi TEL dengan kadar di atas, jumlah larutan yang diaplikasikan adalah 20 µL atau dengan kata lain 1/15 bagian hepar. Jika TEL tidak terdegradasi oleh hepar, seharusnya terlihat bercak TEL dengan Rf seperti pada kalibrasi karena kadar TEL dalam ekstraksi yang diaplikasikan telah melewati batas deteksi plat KLT yang digunakan. Namun pada hasil KLT yang terlihat pada Gambar 9 dan Gambar 10, tidak ditemukan bercak TEL. Dengan demikian besar kemungkinan TEL telah terdegradasi menjadi metabolit-metabolit, yang tidak dapat terdeteksi oleh KLT yang digunakan.

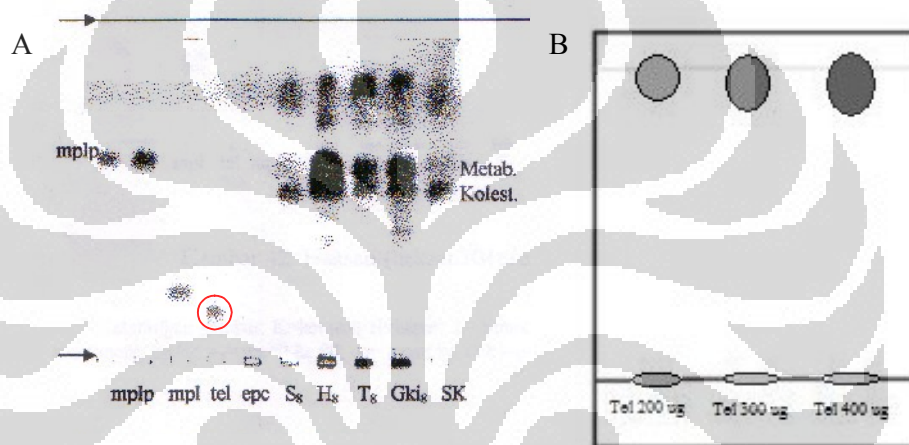
Tidak terdeteksinya produk degradasi (metabolit) TEL yang dihasilkan dapat disebabkan 2 kemungkinan, yaitu:

1. Konsentrasi produk degradasi TEL yang terbentuk terlalu kecil untuk dapat dideteksi dengan KLT. Jumlah produk degradasi berkaitan dengan jumlah TEL yang diberikan pada hepar. Pada kontrol+TEL, kadar TEL yang ditambahkan langsung pada hepar adalah sebesar 148,8 µg. Konsentrasi tersebut sudah melewati batas deteksi KLT, namun pada saat proses kerja, hanya sebagian dari ekstraksi hepar yang diaplikasikan pada KLT (20 µL dari 300 µL larutan). Hal ini dapat memperkecil jumlah masing-masing metabolit TEL yang dihasilkan hingga tidak dapat dideteksi oleh KLT yang digunakan. Begitu pula pada kelompok perlakuan. Pada kelompok perlakuan, kadar TEL

yang diinjeksikan pada mencit sama dengan kadar yang diberikan pada hepar kontrol+TEL. Namun selain jumlah ekstraksi hepar yang diaplikasikan hanya sebagian, pada kelompok perlakuan jumlah TEL yang sampai ke hepar lebih kecil dari kadar yang disuntikkan intraperitoneal, disebabkan ambilan oleh makrofag yang melewati ruang intraperitoneal dan distribusi liposom ke organ-organ yang banyak mengandung RES lainnya, seperti paru-paru, limpa, sumsum tulang, dan ginjal.³ Selain itu jumlah berat sampel hepar yang digunakan pada penelitian ini hanya 200 mg (kurang lebih 1/5 bagian dari berat utuh hepar mencit), sehingga kemungkinan TEL yang sampai pada 1/5 bagian hepar yang diteliti jumlahnya sangat kecil. Dengan kadar TEL pada hepar yang lebih rendah dibandingkan kontrol+TEL, maka seperti pada kontrol+TEL, bercak metabolit TEL pada kelompok perlakuan juga tidak terdeteksi pada KLT. Produk degradasi mungkin akan terlihat dengan lebih baik jika TEL diberikan pada hepar dengan konsentrasi yang lebih besar sehingga konsentrasi produk degradasi TEL yang dihasilkan juga lebih besar.

2. Ketidaksiharaan sifat kepolaran produk degradasi TEL dengan komposisi eluen yang digunakan dalam KLT. Pada KLT, pemisahan zat terjadi karena susbtansi yang akan dipisahkan memiliki perbedaan afinitas terhadap fase diam dan fase gerak, sehingga masing-masing substansi bergerak dengan laju yang berbeda. Dengan demikian, untuk dapat memisahkan campuran zat dengan baik, maka komposisi eluen yang digunakan harus disesuaikan dengan sifat substansi yang akan dipisahkan.¹⁶ Demikian pula pada penelitian ini, untuk memisahkan dan memunculkan bercak produk degradasi TEL, komposisi eluen yang digunakan harus disesuaikan dengan sifat metabolit TEL. Namun hingga saat ini produk standar hasil degradasi TEL sebagai standar pengukuran belum tersedia,⁷ sehingga eluen yang ideal untuk memisahkan metabolit TEL belum diketahui. Untuk mengetahui jenis dan komposisi eluen yang ideal, sebaiknya dilakukan percobaan KLT menggunakan berbagai eluen yang berbeda hingga ditemukan eluen yang paling sesuai. Namun jumlah TEL yang tersedia untuk pembuatan liposom pada penelitian ini terbatas sehingga percobaan tersebut tidak dilakukan.

Dengan demikian penentuan eluen yang digunakan pada penelitian ini merujuk pada penelitian terdahulu mengenai liposom EPC-TEL 2,5 oleh Purwaningsih, yang menggunakan TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius*. Pada penelitian tersebut, dengan eluen kloroform-etanol 9:1 dihasilkan bercak TEL *Sulfolobus acidocaldarius* yang terlihat jelas dengan R_f 0,16.²⁷ Namun pada uji coba KLT menggunakan komposisi eluen tersebut (kloroform:etanol 9:1), bercak TEL kalibrasi pada penelitian ini berada sangat dekat dengan batas akhir elusi sehingga menyulitkan pembacaan bercak. Berikut perbandingan bercak TEL pada kedua penelitian:



Gambar 11. Perbandingan bercak TEL pada penelitian Purwaningsih dan penelitian ini dengan menggunakan eluen kloroform-etanol 9:1. Gambar A menunjukkan bercak TEL *Sulfolobus acidocaldarius* pada penelitian Purwaningsih, dengan R_f 0,16. Gambar B menunjukkan bercak TEL *Thermoplasma acidophilum* pada penelitian ini, dimana bercak terletak dekat dengan batas akhir elusi, sehingga menyulitkan pembacaan.

Karena hasil yang menyulitkan pembacaan bercak, dilakukan percobaan KLT menggunakan eluen dengan perbandingan yang berbeda, yaitu kloroform-etanol 7:3. Dengan eluen tersebut, bercak TEL pada kalibrasi terlihat lebih baik dibandingkan dengan eluen kloroform-etanol 9:1 karena bercak terletak di bawah batas akhir eluen, meskipun pembacaan bercak masih sulit dilakukan. Dari temuan ini dapat terlihat perbedaan kecocokan eluen antara TEL pada penelitian oleh Purwaningsih (dari *Sulfolobus acidocaldarius*)

dengan TEL yang digunakan pada penelitian ini (dari *Thermoplasma acidophilum*). Hal ini dapat disebabkan perbedaan sifat kepolaran TEL yang digunakan dalam kedua penelitian, sehingga afinitasnya terhadap plat dan eluen juga berbeda. Plat yang digunakan pada kedua penelitian adalah plat silika yang bersifat polar, sementara sebagai eluen, kloroform bersifat lebih non polar dibandingkan etanol. Berdasarkan hasil percobaan di atas, TEL yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum* diduga bersifat lebih non polar dibandingkan TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* karena afinitasnya terhadap eluen kloroform-etanol 9:1 yang lebih tinggi dibandingkan afinitas TEL *Sulfolobus acidocaldarius* terhadap eluen yang sama, sehingga bercak TEL pada percobaan bergerak lebih ke atas sampai mendekati batas akhir elusi. Dugaan ini diperkuat dengan hasil percobaan yang kedua, dimana dilakukan penambahan etanol sekaligus pengurangan kloroform menjadi kloroform-etanol 7:3. Perubahan tersebut menambah sifat kepolaran eluen sehingga afinitas TEL *Thermoplasma acidophilum* terhadap eluen berkurang dan menghasilkan bercak yang terletak lebih di bawah. Berdasarkan hasil tersebut, untuk mendapatkan bercak TEL yang terletak lebih jauh dari garis batas elusi, maka dilakukan percobaan KLT menggunakan eluen yang lebih polar, yaitu kloroform-etanol 6:4. Dengan eluen tersebut bercak TEL kalibrasi terlihat lebih baik sehingga dapat dilakukan pembacaan bercak dan pengukuran *Rf*. Dengan demikian komposisi eluen yang digunakan dalam penelitian adalah kloroform-etanol 6:4, yang menghasilkan bercak TEL kalibrasi dengan rata-rata *Rf* 0,6. Namun eluen tersebut mungkin masih belum sesuai dengan metabolit dari TEL, sehingga bercak metabolit TEL tidak terlihat.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini, ada atau tidaknya degradasi TEL oleh hepar dalam waktu 4 jam setelah injeksi liposom intraperitoneal belum dapat diketahui karena bercak TEL, baik pada kelompok kontrol + TEL maupun perlakuan, tidak tampak pada plat KLT.

5.2. Saran

Penelitian mengenai degradasi TEL oleh hepar ini sebaiknya dilanjutkan agar liposom EPC-TEL 2,5 dapat dikembangkan menjadi pembawa obat yang aman digunakan. Sebaiknya penelitian dilakukan menggunakan alat yang dapat mendeteksi zat dengan konsentrasi yang lebih kecil dibandingkan dengan KLT, seperti *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) yang dapat mendeteksi suatu bahan dengan kadar sampai dengan 100-500 pg.²⁸

Jika tetap menggunakan KLT, sebaiknya kadar TEL yang diberikan pada mencit ditingkatkan. Selain itu perlu dilakukan penelitian mengenai jenis dan komposisi eluen pada KLT yang paling sesuai untuk memisahkan produk degradasi TEL dengan baik.

Jika terbukti bahwa TEL dapat terdegradasi, sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan mengenai enzim yang mendegradasinya di dalam hepar, serta struktur dan sifat molekul produk degradasi TEL.

DAFTAR PUSTAKA

1. Calabresi P, Chabner BA. Antineoplastic agents. In: Goodman and Gilman (eds). The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed. (II). Maxwell Macmillan; 1991. p. 1209-63.
2. Rogers CS, et al. Gene Therapy. In: Goodman Gilman (eds). The Pharmacological Basis of Therapeutic. 10th Ed. Maxwell Macmillan; 2001. p. 90.
3. New RRC, editors. Liposomes: A Practical Aproach. Oxford: IRL PRESS; 1990. p. 1-31, 105-10, 221-7.
4. Freisleben HJ, Neisser C, Hartmann M, Rudolph P, Geck P, Ring K, Muller WEG. Influence of the Main Phospholipid (MPL) from *Thermoplasma acidophilum* and of Liposomes from MPL on Living Cells: Cytotoxicity and Mutagenicity. J Liposom Research. 1993;3(3):817-33.
5. Purwaningsih EH, Freisleben HJ, Sadikin M. Peningkatan Inkorporasi Metilprednisolon Palmitat pada Liposom yang Mengandung Tetra Eter Lipid dari Membran *Sulfolobus Acidocaldarius* Membentuk Sediaan Baru Liposomal Metilprednisolon Palmitat. Jurnal Farmasi Indonesia 2002;1(1):24-30.
6. Lasic DD.(ed). Liposoms as a drug delivery system. Liposoms from Physics to Application. Elsevier Science Publisher BV; 1993. p. 263-324.
7. Bergstrand N. Liposomes for Drug Delivery: from Physico-chemical Studies to Applications. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis; 2003.
8. Purwaningsih EH. Inkorporasi Metilprednisolon Palmitat pada Membran Liposom yang Mengandung Tetra Eter Lipid Berasal dari Archaea serta Gambaran Distribusinya pada Beberapa Organ Limfoid pada Mencit. Jakarta: Universitas Indonesia; 2002.
9. Jufri M. Arah dan Perkembangan Liposome Drug Delivery Systems. Majalah Ilmu Kefarmasian Agustus 2004; 1(2):59-68.
10. Freisleben HJ, Mentrup E. Preparation and Properties of Liposomes Containing Vitamin E. In: Packer L, Fuchs J (ed). Vitamin E in Health and Disease. CRC Press; 1993. p. 193.

11. Frezard F. Liposomes: From Biophysics to the Design of Peptide Vaccines. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32(2): 181-9.
12. Tesoriere L, Bongiorno A, Pintaudi AM, D'Anna R, D'Arpa D, Livrea MA. Synergistic Interaction between Vitamin A and Vitamin E Against Lipid Peroxidation in Phosphatidylcholine Liposomes. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 326(1):57-63.
13. Freisleben HJ, et al. Fermentor Cultivation of *Thermoplasma acidophilum* for the Production of Cell Mass and the Main of Phospholipid Fraction. *Appl Microbiol Biotech.* 1994; 40: 745-52.
14. Stern J, Freisleben HJ, Janku S, Ring K. Black Lipid Membranes of Tetraether Lipids from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1128(2-3): 227-36.
15. Sugai A, et al. The Structure of the Core Polyol of the Ether Lipids from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Lipids.* 1995; 30(4): 339-44.
16. Clark J. Thin Layer Chromatography. Diunduh dari: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chomatography/thinlayer.html>. 15 April 2007
17. Freisleben HJ, et al. Toxicity and Biodistribution of Liposomes of the Main Phospholipid from the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum* in Mice. *J Liposome Research* 1995;5(1):215-23
18. Langworthy TA, Smith PF, Mayberry WR. Lipids of *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of Bacteriology* 1972; 112(3): 1193-200.
19. Bohlool BB, Brock D. Immunodiffusion Analysis of Membranes of *Thermoplasma acidophilum*. *J Infection and Immunity* 1974; 10(1): 280-1.
20. Freisleben HJ. Tetraether Lipid Liposomes. In: Zimmer G, editor. *Membrane Structure in Disease and Drug Therapy*. London: CRC Press. 2000; p.127-49.
21. Anonymous. Basic Principles of TLC. Diunduh dari: ftp://ftp.mn-net.com/english/Flyer_Catalogs/Chromatography/Catalogue-en/TLC.pdf. 20 April 2008. 14:52.
22. Shimizu S. Routes of Administration. In: *The Laboratory Mouse*. Italy: Elsevier Saunders; 2006. p. 527-35.

23. Effendi AR. Efek Liposom Metilprednisolon Palmitat terhadap Kadar TNF α dan Distribusinya di Hepar dan Limpa Mencit. Tesis Program Studi Ilmu Biomedik FKUI, Program Pascasarjana UI, November 2002.
24. Arozal W, Suyatna FD, Purwaningsih EH, Dewoto HR. Peningkatan Efek Antiinflamasi Sediaan Metilprednisolon dalam Bentuk Liposom. MKI 2005;56(1):17-22.
25. 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.
26. Anonymous. Biodegradation. Diunduh dari: <http://en.wikipedia.org/wiki/Biodegradation>. 21 April 2008. 19:42.
27. Purwaningsih EH, Sadikin M, Soeradi O, Rasad A, Freisleben HJ. Distribusi Liposomal-Metilprednisolon Palmitat (L-MPLP) Pada Beberapa Organ Mencit Setelah Pemberian Intraperitoneal. Makara Kesehatan 2004;8(2):65-72.
28. Anonymous. Thin Layer Chromatography by Merck. Diunduh dari: http://uk.vwr-cmd.com/ex/downloads/?newsletter/uk/tlc_merck.pdf. 2007.

LAMPIRAN 1
JADWAL KEGIATAN PENELITIAN

Tabel 2. Jadwal kegiatan penelitian

2007

No	Kegiatan	Mar	Apr	Mei	Jun	Jul	Ags	Sept	Okt	
1	Perencanaan	—								
2	Pelaksanaan	—————						—		
3	Analisis data						—————			
4	Laporan									

2008

No	Kegiatan	Nov	Des	Jan	Feb	Mar
1	Perencanaan					
2	Pelaksanaan					
3	Analisis data	—————				
4	Laporan				—————	

LAMPIRAN 2

PERHITUNGAN DOSIS LIPOSOM DAN KALIBRASI

A. Perhitungan EPC dan TEL

Pembuatan liposom dilakukan bersama dengan peneliti lain yang tergabung dalam penelitian induk. Pembuatan liposom dilakukan setiap kali memulai satu gelombang sehingga jumlah EPC dan TEL yang disiapkan disesuaikan dengan jumlah sampel pada tiap gelombang. Jumlah seluruh sampel pada penelitian induk adalah 24 ekor yang terbagi menjadi 6 kelompok perlakuan (0 menit, 30 menit, 60 menit, 2 jam, 4 jam, dan 8 jam). Karena penelitian dilakukan dalam 4 gelombang, jumlah sampel pada tiap gelombang adalah 6 ekor.

Jumlah EPC dan TEL yang disiapkan per gelombang dihitung untuk minimal jumlah sampel + (jumlah sampel x 10%), yaitu minimal $6 + (6 \times 10\%) = 7$ mencit. Pada penelitian ini diambil jumlah mencit 8 ekor. Dengan demikian jumlah EPC dan TEL disiapkan dengan perhitungan sebagai berikut:

- EPC-TEL 2,5 mol %, maka perbandingan mol EPC:TEL adalah 40:1. Perbandingan mol EPC:TEL yang dipakai dalam penelitian ini adalah 4 mmol:0,1 mmol.
- Perhitungan EPC 4 mmol
1 mmol setara dengan 0,78 mg
 $4 \text{ mmol} = 0,78 \times 4 = 3,12 \text{ mg}$
Jumlah EPC yang disiapkan per gelombang: $8 \times @ 3,12 \text{ mg} \approx 25 \text{ mg}$.
- Perhitungan TEL 0,1 mmol
Berat molekul TEL $\sim 1488,4$
 $1 \text{ mol} = \text{BM} / \text{L} = 1488,4 \text{ g/L}$
 $1 \text{ mol} = 1488,4 \text{ mg/mL}$
 $1 \text{ mmol} = 1,4884 \text{ mg/mL}$
 $0,1 \text{ mmol} = 0,14884 \text{ mg/mL}$
Jumlah TEL yang disiapkan per gelombang: $8 \times @ 0,1 \text{ mmol} = 8 \times 0,14884 \text{ mg} = 1,1904 \text{ mg} \approx 1,2 \text{ mg}$.

B. Perhitungan Kalibrasi

4. Kalibrasi TEL 75 ug, 150 ug, dan 300 ug:

TEL yang tersedia adalah 15,2 mg dalam 10,1 ml kloroform:metanol 2:1, maka untuk mendapatkan konsentrasi 75 ug, 150 ug dan 300 ug, digunakan perhitungan:

Dalam 1 ml terdapat: $15,2 \text{ mg}/10,1 \text{ mL} = 1,504 \text{ mg/mL}$

X = volume yang dibutuhkan

$$X/1\text{mL} \times 1,504 \text{ mg} = 75 \text{ ug}$$

$$X/1\text{mL} \times 1,504 \text{ mg} = 75 \text{ mg} \times 10^{-3}$$

$$X = 75/1,504 \text{ mL} \times 10^{-3}$$

$$X = 49,8670212 \text{ mL} \times 10^{-3}$$

$$X \approx 50 \text{ ul.}$$

Dapat disimpulkan bahwa tiap pengambilan 50 ul didapatkan konsentrasi/TEL sebesar 75 ug. Dengan demikian:

- untuk kalibrasi 75 ug dibutuhkan 50 ul
- untuk kalibrasi 150 ug dibutuhkan 100 ul
- untuk kalibrasi 300 ug dibutuhkan 200 ul

5. Kalibrasi TEL 100, 200, dan 300 ug.

Untuk mendapatkan TEL dengan konsentrasi 100, 200, dan 300 ug dilakukan perhitungan sebagai berikut:

TEL yang tersedia 90 mg yang dilarutkan dalam 4,5 mL kloroform:metanol 2:1.

X = volume yang dibutuhkan

Untuk mendapatkan TEL dengan konsentrasi 100 ug dibutuhkan:

$$X/4,5 \text{ mL} \times 90 \text{ mg} = 100 \text{ ug}$$

$$X = (100 \text{ ug} \times 4,5 \text{ mL}) : 90 \text{ mg} = 5 \text{ ul, dengan demikian:}$$

- untuk kalibrasi 100 ug dibutuhkan 5 ul
- untuk kalibrasi 200 ug dibutuhkan 10 ul
- untuk kalibrasi 300 ug dibutuhkan 15 ul

6. Kalibrasi TEL 200, 300, dan 400 ug.

Untuk mendapatkan TEL dengan konsentrasi 200, 300, dan 400 ug dilakukan perhitungan sebagai berikut:

TEL yang tersedia 15 mg dalam 0,75 mL.

X = volume yang dibutuhkan

Untuk mendapatkan TEL dengan konsentrasi 200 ug dibutuhkan:

$$X/0,75 \text{ mL} \times 15 \text{ mg} = 200 \text{ ug}$$

$$X = (200 \text{ ug} \times 0,75 \text{ mL}) : 15 \text{ mg} = 10 \text{ ul, dengan demikian:}$$

- untuk kalibrasi 200 ul dibutuhkan 10 ul
- untuk kalibrasi 300 ul dibutuhkan 15 ul
- untuk kalibrasi 400 ul dibutuhkan 20 ul



LAMPIRAN 3
DATA MENCIT

Tabel 3. Data berat mencit dan hepar mencit yang digunakan dalam penelitian

Kelompok	Mencit	Berat mencit	Berat hepar
Kontrol	1	20,2 gram	1 gram
	2	22,4 gram	1,1 gram
	3	19,2 gram	850 mg
	4	20,85 gram	920 mg
Perlakuan 4 jam	1	20 gram	950 mg
	2	20 gram	1050 mg
	3	19,8 gram	1270 mg
	4	21,5 gram	970 mg

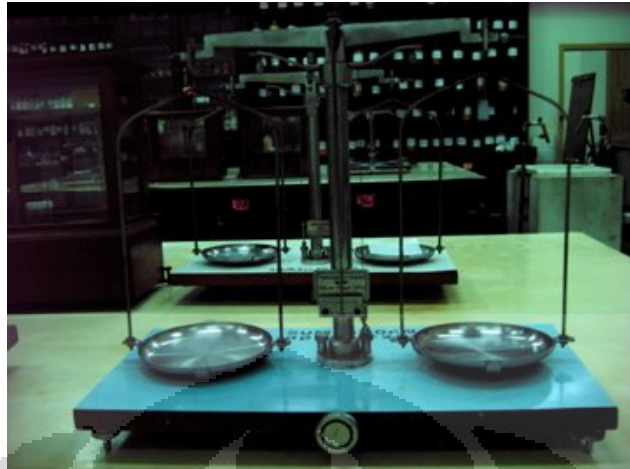
LAMPIRAN 4
GAMBAR



Gambar 12. Rotavapor vacuum pump waterbach Buchi



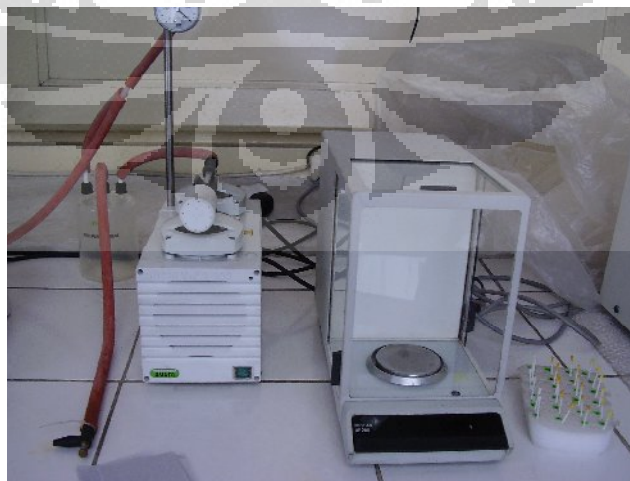
Gambar 13. Alat sentrifugasi Sorvall Biofuge Primo



Gambar 14. Timbangan gram



Gambar 15. Timbangan miligram



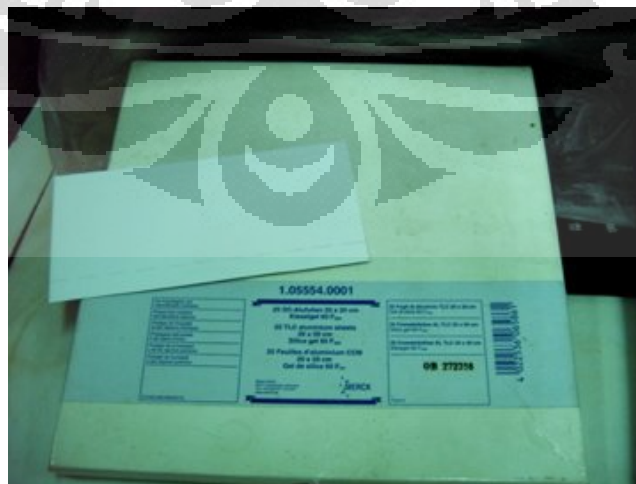
Gambar 16. Timbangan mikrogram Mettler AE 200



Gambar 17. *Microliter Syringes Hamilton*



Gambar 18. *Micropipette Socorex*



Gambar 19. *TLC sheet silica gel 60 F254 Merck*



Gambar 20. *Chamber* atau wadah yang digunakan pada KLT



Gambar 21. Larutan tembaga asetat 3% dan asam fosfat 8%