



**PENGUKURAN DIAMETER LIPOSOM EPC-TEL 2,5
HASIL SONIKASI YANG TERPAJAN LARUTAN CaCl_2
150 mOsmol pH 7 SECARA KUANTITATIF**

OLEH :

**Achmad Rafli
0105000042**

SKRIPSI

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

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

LEMBAR PENGESAHAN

NAMA : ACHMAD RAFLI
NOMOR POKOK MAHASISWA : 0105000042
INSTITUSI : FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS INDONESIA

JUDUL PENELITIAN :

PENGUKURAN DIAMETER LIPOSOM EPC-TEL 2,5 HASIL SONIKASI YANG TERPAJAN LARUTAN CaCl_2 150 mOsmol pH 7 SECARA KUANTITATIF

Dosen Pembimbing

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

Mengetahui,
Ketua Modul Riset 2008-2009

Dr. dr. Saptawati Bardosono, MSc
NIP. 140 102 741

KATA PENGANTAR

Puji syukur dan segala puji bagi Allah SWT penulis panjatkan karena hanya dengan rahmat-Nya lah penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul **“Pengukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Yang Terpajan Larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 Secara Kuantitatif”** ini.

Skripsi 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. dr. Saptawati Bardosono, MSc selaku Ketua Modul Riset 2008-2009 yang telah meluangkan banyak waktu untuk memberikan bimbingan masukan dan bantuan kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini
1. 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 skripsi ini.
2. Dr. Taniawati S., SpPK yang telah memberi masukan yang bermanfaat dalam pengolahan data kepada penulis.
3. Bapak Dendy dari Departemen Fisika Kedokteran Universitas Indonesia, yang telah membantu penulis memahami penggunaan program *Image Pro Express 4.5*.
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. Nelfidayani, dkk yang telah mengizinkan hasil dokumentasi penelitiannya untuk digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini.
6. Teman-teman seperjuangan dalam riset mengenai liposom, khususnya Andita Dwi Hidayati, Anandhara Indriani K., dan Anak Agung Rai DM. Terima kasih telah saling membantu, mendukung, dan memberi semangat selama proses penelitian ini.
7. Orangtua penulis atas doa, pengertian, dan dorongan semangat yang selalu diberikan kepada penulis.

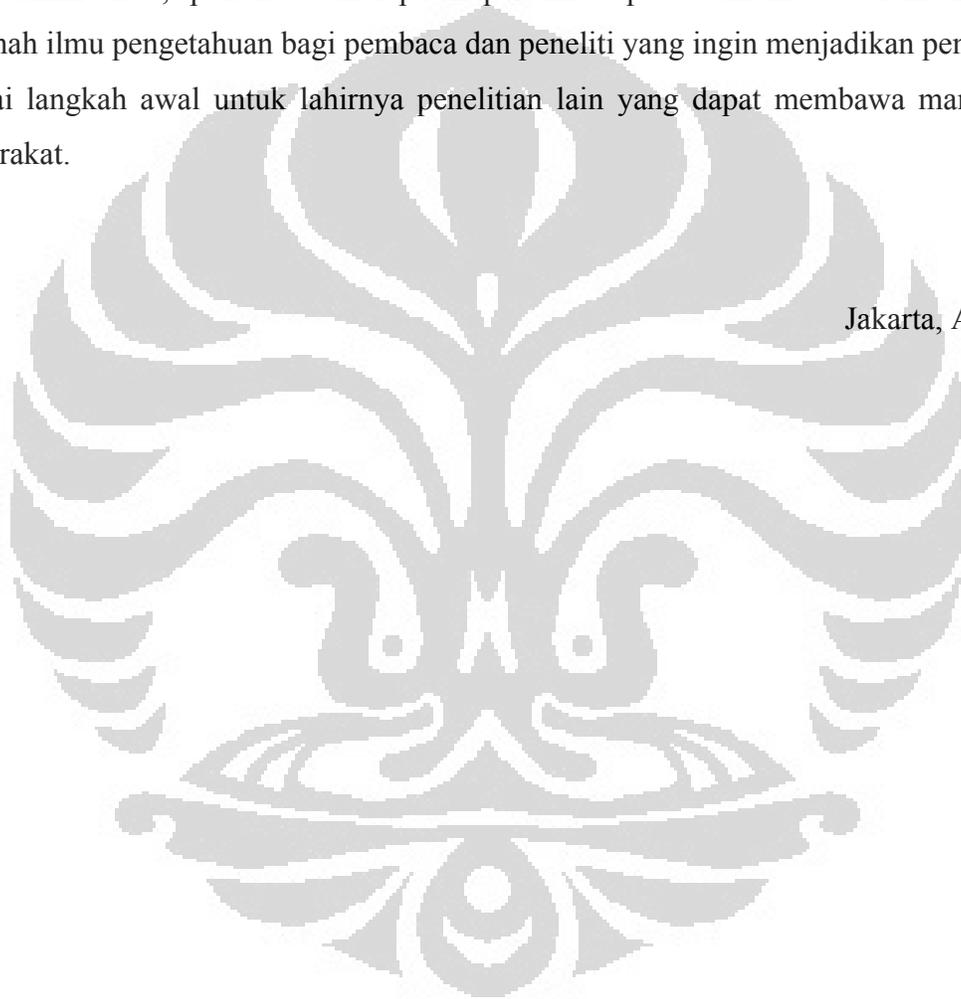
8. Teman-teman angkatan 2005 lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah memberikan dukungan kepada penulis untuk terus semangat dalam melaksanakan penelitian dan menuliskan skripsi ini.

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 skripsi ini dapat bermanfaat dalam menambah khazanah 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, April 2009

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR SINGKATAN	vii
ABSTRAKSI	viii
ABSTRAK	viii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Liposom	5
2.1.1 Liposom Secara Umum.....	5
2.1.2 Komponen Liposom.....	6
2.1.2.1 Struktur Kimia	
2.1.3 Klasifikasi Liposom.....	8
2.1.4 Metode Penentuan Ukuran Liposom	9
2.1.5 Metode Pembuatan Liposom	11
2.1.6 Konsep Liposom sebagai Pembawa Obat.....	11
2.1.6.1 Ukuran Liposom	12
2.1.6.2 Stabilitas Membran	12
2.2 Tetraeter Lipid	13
2.2.1 <i>Thermoplasma acidophilum</i>	13

2.2.2	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	14
2.3	<i>Egg-yolk Phosphatidyl Choline (EPC)</i>	15
2.4	Garam Fisiologis: Kalsium Klorida (CaCl_2).....	16
2.5	Program <i>Image Pro Express 4.5</i>	16
2.6	Kerangka Konsep.....	17
BAB III	METODE PENELITIAN	18
3.1	Desain Penelitian	18
3.2	Tempat dan Waktu.....	18
3.3	Populasi dan Sampel.....	18
3.4	Besar Sampel.....	18
3.5	Cara Pengambilan Sampel.....	19
3.6	Alur Penelitian.....	20
3.7	Alat dan Bahan.....	20
3.8	Cara Kerja.....	21
3.9	Definisi Operasional.....	23
3.10	Analisis Data.....	24
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	25
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	30
5.1	Kesimpulan	30
5.2	Saran	30
	DAFTAR PUSTAKA	31
	LAMPIRAN	34

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Liposom.....	6
2. Struktur Fosfolipid.....	7
3. Membran Liposom dengan Tetra Eter Lipid.....	8
4. Struktur Tetra Eter Lipid (TEL) pada <i>Thermoplasma acidophilum</i>	14
5. Struktur Fraksi E Lipid Polar.....	15
6. Skala <i>Olympus</i> dengan Pembesaran 400x.....	21
7. Cara Pengukuran ke-1 Diameter Liposom dengan Program <i>Image Pro Express 4.5</i>	22
8. Cara Pengukuran ke-2 Diameter Liposom dengan Program <i>Image Pro Express 4.5</i>	23

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Pengukuran Skala <i>Olympus</i> dengan Menggunakan Program <i>Image Pro Express 4.5</i>	25
2. Hasil Pengukuran Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Dalam Larutan CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 suhu 4 °C pada Hari ke-.....	26
3. Rata-Rata Ukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Ukuran Besar (≥ 100 nm) Dalam Larutan CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 suhu 4 °C pada Hari ke-0.....	26
4. Rata-Rata Ukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Ukuran Kecil (≤ 100 nm) Dalam Larutan CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 suhu 4 °C pada Hari ke-0.....	27
5. Hasil Pengukuran Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Dalam Larutan CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 suhu 4 °C pada Hari ke-90.....	27
6. Rata-Rata Ukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Ukuran Besar (≥ 100 nm) Dalam Larutan CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 suhu 4 °C pada Hari ke-90.....	28
7. Rata-Rata Ukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Ukuran Kecil (≤ 100 nm) Dalam Larutan CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 suhu 4 °C pada Hari ke-90.....	28

DAFTAR SINGKATAN



C	Celsius
Ca ²⁺	ion Kalsium
CaCl ₂	<i>Calcium Chloride</i>
Cl ⁻	ion klorida
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPPC	<i>Dipalmitoylphosphatidyl Choline</i>
DPPG	<i>Dipalmitoylphosphatidyl Glycerol</i>
EPC	<i>Egg-yolk Phosphatidyl Choline</i>
GDNG	<i>Glycerol Dialkylnonitol Glycerol</i>
GDNT	<i>Glycerol Dialkylnonitol Tetraether</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
IUV	<i>Intermediate-sized Unilamellar Vesicles</i>
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicles</i>
MLV	<i>Multilamellar Vesicles</i>
MVL	<i>Multi Vesicular Liposomes</i>
Na ⁺	ion natrium
mOsmol	mili Osmolaritas
nm	nanometer
µm	mikrometer
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PLFE	<i>Polar Lipid Fraction E</i>
SPC	<i>Soybean Phosphatidyl Choline</i>
SPV	<i>Small Plurilamellar Vesicles</i>
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicles</i>
TEL	<i>Tetraether Lipid</i>

ABSTRAK

Diameter liposom adalah satu dari beberapa parameter untuk menentukan kestabilan liposom sebagai pembawa obat. Namun, banyak masalah yang telah ditemukan dalam pengukurannya seperti alat yang digunakan untuk mengukur diameter liposom (*particle seizer*) sangat mahal, ukuran liposom yang diukur dengan alat ini memiliki nilai yang bervariasi karena pergerakan *Brownian* dari liposom. Dalam penelitian sebelumnya, pengukuran diameter liposom hasil sonikasi EPC-TEL 2,5 dengan penambahan larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 selama 90 hari yang menggunakan skala *Olympus*, tidak hanya membutuhkan waktu yang lama, tetapi juga data yang didapatkan hanya dalam skala kategorik. Untuk mengukur diameter liposom secara tepat (kuantitatif), program *Image Pro Express 4.5* digunakan pada penelitian ini. Hasil yang didapatkan adalah ukuran rata-rata diameter liposom EPC-TEL 2,5 yang termasuk kategori liposom besar (≥ 100 nm) pada hari ke-0 dan hari ke-90 adalah 112,09 nm dan 121,96 nm; untuk liposom kecil (≤ 100 nm) adalah 73,94 nm dan 66,52 nm.

Kata Kunci: Liposom EPC-TEL 2,5, diameter, CaCl₂, Image Pro Express 4.5.

ABSTRACT

The diameter of liposome is one of several parameters to determine the stability of liposome as drug carrier. But, many problems were found in our laboratory to measure it. The problems were the equipment to measure the diameter of liposome that has famous named of particle seizer was too expensive; the size of liposome that has detected with this equipment has many variable values because of the Brownian movement of liposome. In our previous study, measuring the diameter of liposome EPC-TEL 2,5 from sonication with adding of CaCl_2 150 mOsmol in pH 7 for 90 days, which has used the Olympus scale, not only time consuming but also the diameter data were the categorical level. To measure the exact diameter of liposome (quantitative), the Image Pro Express 4.5 has used in this experiment. The results were shown that the average size of diameter of big liposome at day 0 and 90 are 112,09 nm and 121,96 nm; for small liposome, the average size of diameter are 73,94 nm and 66,52 nm.

Keywords: Liposome EPC-TEL 2,5, diameter, CaCl₂, Image Pro Express 4.5.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Saat ini, para peneliti dalam bidang farmasi berusaha untuk membuat suatu sistem pembawa obat yang dapat melokalisasi obat dan hanya mempengaruhi organ/jaringan yang mengalami kerusakan.¹⁻³ Sistem pembawa obat tersebut salah satunya adalah liposom. Liposom adalah vesikel sederhana di mana inti air seluruhnya diselubungi oleh membran yang terdiri dari molekul lipid. Struktur dan kegunaan liposom menyerupai membran biologis yang berupa dwilapis lipid, membuat liposom sangat aman dan menjadi pembawa obat yang efektif untuk aplikasi medis.⁴

Sebagai pembawa obat, dosis terapi suatu obat dalam liposom dapat dicapai tanpa memerlukan dosis tinggi. Hal ini berguna untuk meningkatkan potensi obat dan diharapkan dapat mengurangi toksisitas terapeutik.^{1,2,5} Selain itu, liposom juga mudah dibuat dan lebih murah dibandingkan dengan zat pembawa obat lainnya dan dapat melarutkan obat lipofilik yang sulit diberikan secara intravena.⁶

Salah satu pengembangan liposom sebagai pembawa obat yang diteliti adalah menggunakan kombinasi fosfatidil kolin kuning telur (*Egg-yolk Phosphatidyl Choline / EPC*) dengan Tetraeter Lipid (TEL) dari *Thermoplasma acidophilum* dengan kadar, yaitu 2,5 mol%.⁷⁻⁹ Liposom dengan formulasi baru ini dikenal dengan nama liposom EPC-TEL 2,5. Pada beberapa penelitian yang telah dilakukan, liposom ini telah terbukti stabil pada suhu tinggi (59 °Celsius) dan suasana asam (pH 1-2).^{7,8} Liposom EPC-TEL 2,5 juga terbukti dapat meningkatkan efek terapi imunologik obat dan terdistribusi dengan baik dalam organ.^{9,10}

Liposom sebagai pembawa obat harus memenuhi persyaratan tertentu, yaitu stabilitas baik fisik, kimia, maupun biologi.⁴ Liposom yang stabil secara fisik, kimia, dan biologi akan dapat membawa obat dengan lebih baik hingga mencapai target dan tujuannya. Pengujian kestabilan liposom secara kimia dapat dilakukan dengan menggunakan pemaparan garam-garam fisiologis seperti, Na⁺, Ca²⁺, dan Cl⁻ (komponen elektrolit utama dalam tubuh manusia). Parameter kestabilan ditentukan/diukur berdasarkan diameter liposom yang berubah/menetap, baik secara kualitatif maupun kuantitatif.⁵

Beberapa penelitian telah membuktikan kestabilan liposom EPC-TEL 2,5 secara kimia.¹¹ Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi stabil tanpa dipengaruhi jenis garam pada konsentrasi 150 mOsmol dalam waktu penyimpanan 90 hari pada suhu 4°C pada pH netral, asam, dan basa. Namun, penelitian tersebut menggunakan teknik pengukuran liposom yang termasuk jenis ordinal atau kategorik sehingga hasil pengukurannya tidak begitu sensitif.¹¹

Telah diketahui bahwa terdapat beberapa teknik yang telah digunakan dalam pengukuran diameter liposom seperti pengukuran secara manual dengan menggunakan skala *Olympus* yang merupakan salah satu skala baku yang memiliki ukuran dalam nano meter (nm), pengukuran dengan mikroskop elektron, analisis *light scattering*, *laser light scattering*, dan *particle seizer*.³ Di antara teknik-teknik tersebut yang paling akurat dalam pengukuran liposom adalah dengan menggunakan *particle seizer*.¹² Hal ini disebabkan oleh selain dapat diukur diameter liposom, dengan *particle seizer* dapat diketahui pula diameter rata-rata serta distribusi ukuran liposom. Namun, salah satu kendala yang masih dihadapi sampai saat ini adalah harga *particle seizer* yang sangat mahal.¹²

Saat ini, para ahli telah mengembangkan suatu program yang dapat melakukan pengukuran sel secara kuantitatif, yaitu *Image Pro Express 4.5*.^{13,14} Namun, belum ada satupun penelitian yang melakukan pengukuran diameter liposom dengan menggunakan program tersebut. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi setelah liposom tersebut terpajan dengan salah satu garam fisiologis, yaitu Kalsium klorida (CaCl_2) 150 mOsmol pada pH 7 dan diberi pewarnaan Quinakrin 0,2% selama penyimpanan 90 hari dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5*. Hal ini bertujuan agar didapatkannya suatu metode pengukuran diameter liposom yang lebih sensitif, akurat, dan dengan harga yang lebih murah bila dibandingkan dengan *particle seizer*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang, mengacu pada hasil penelitian Rachmawati¹¹ yang belum pernah melakukan pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi 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 nilai ukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan pemaparan garam Kalsium klorida (CaCl_2) 150 mOsmol pada pH 7 selama penyimpanan 90 hari pada suhu 4°C dapat diukur secara kuantitatif dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5*?
2. Apakah terdapat perubahan diameter EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan pemaparan garam Kalsium klorida (CaCl_2) 150 mOsmol pada pH 7 selama penyimpanan 90 hari pada suhu 4°C yang diukur secara kuantitatif dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan pemaparan garam Kalsium klorida (CaCl_2) 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dan hari ke-90 secara kuantitatif.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi berukuran besar ($\geq 100\text{ nm}$) dengan pemaparan garam Kalsium klorida (CaCl_2) 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dan 90 secara kuantitatif dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5*.
2. Mengukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi berukuran kecil ($\leq 100\text{ nm}$) dengan pemaparan garam Kalsium klorida (CaCl_2) 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dan 90 secara kuantitatif dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5*.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Bila liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan pemaparan garam Kalsium klorida (CaCl_2) 150 mOsmol pada pH 7 selama penyimpanan 90 hari pada suhu 4°C 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 dan fisika dengan cara mengukur diameter liposom.
2. Didapatkannya suatu metode alternatif pengukuran liposom yang memiliki keakuratan, sensitifitas yang baik serta dengan harga yang murah.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Liposom

2.1.1 Liposom Secara Umum

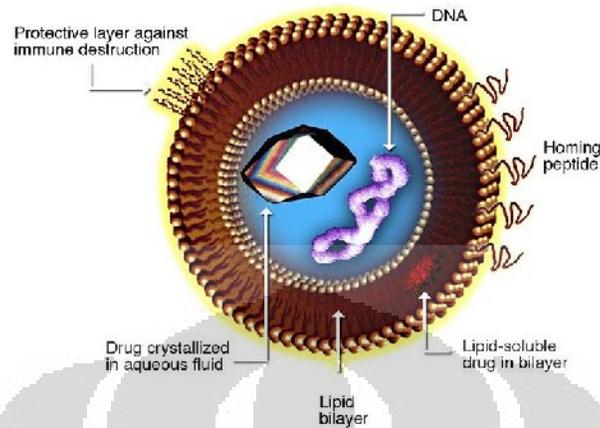
Liposom adalah suatu vesikel sederhana, yang dibentuk dengan cara mendispersikan suatu lipid, terutama fosfolipid, ke dalam media cair dan memiliki sifat-sifat yang dipersyaratkan sebagai bahan pembawa atau *drug-carrier*.^{15,16} Berbagai jenis molekul lipid ampifilik dapat digunakan untuk membentuk dwilapis lipid (*lipid bilayer*) pada liposom. Yang dimaksud dengan molekul ampifilik adalah molekul yang memiliki dua grup, yaitu grup hidrofilik (kepala polar) dan grup hidrofobik dengan solubilitas berbeda dalam cairan.¹⁷ Struktur dan kegunaan liposom menyerupai membran biologis yang berupa dwilapis lipid, membuat liposom sangat aman dan menjadi pembawa obat yang efektif untuk aplikasi medis.⁴

Struktur dan kegunaan liposom pertama kali ditemukan oleh Alec Bangham yang berasal dari *Cambridge* pada awal tahun 1960 dan sejak saat itu liposom telah digunakan sebagai alat multifungsional dalam bidang kedokteran.¹⁸ Namun, liposom sebagai pembawa obat telah lebih dulu dipatenkan di Jerman pada tahun 1943 berupa campuran lesitin dan kolesterol.¹⁹

Sebagai pembawa obat, liposom harus memenuhi beberapa persyaratan seperti, memiliki stabilitas yang baik secara kimia, biologi, dan fisika; tidak toksik; biokompatibel; mudah didegradasi oleh tubuh; dan tidak bersifat imunogenik, mutagenik atau antimutagenik.²⁰⁻²¹ Di sisi lain, terdapat beberapa keunggulan penggunaan liposom sebagai pembawa obat seperti,^{19,22}

1. Liposom dapat mengarahkan obat pada target tertentu.
2. Liposom dapat memperpanjang durasi paparan obat dan berfungsi sebagai reservoir yang melepaskan obat dengan perlahan.
3. Liposom dapat melindungi obat dari degradasi seperti, degradasi metabolik.
4. Penelitian membuktikan bahwa liposom dapat memperpanjang waktu paruh obat serta dapat memperbesar distribusi obat ke organ sasaran secara selektif sehingga dosis obat dapat dikurangi. Dengan demikian, efek samping obat akan dapat ditekan seminimal mungkin.

Liposome for Drug Delivery



Gambar 1. Struktur Liposom²³

2.1.2 Komponen Liposom

2.1.2.1 Struktur Kimia

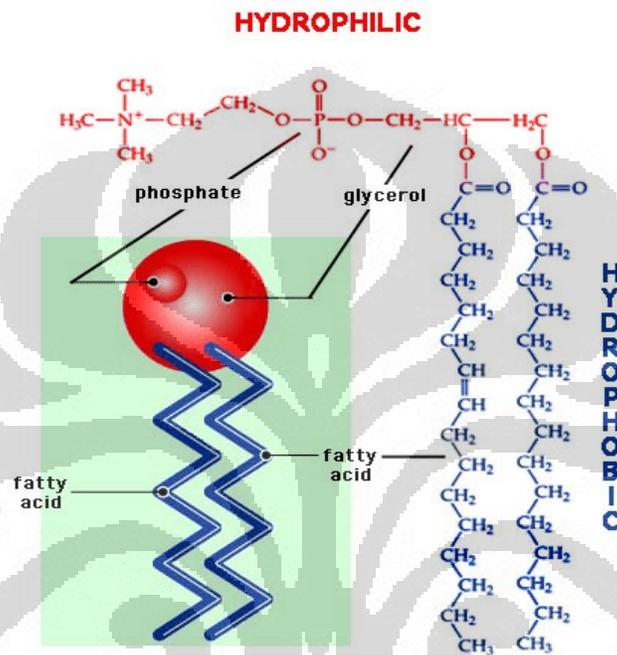
Komponen utama liposom adalah fosfolipid yang merupakan lipid membran biologis terbanyak dan berfungsi sebagai unsur struktural membran. Golongan lipid ini mengandung fosfor dalam bentuk gugus asam fosfat.

Dalam lingkungan air, kebanyakan fosfolipid berstruktur lapisan dwimolekuler dan bukan misel.^{3,17,24} Hal ini disebabkan oleh kedua rantai asam lemak fosfolipid terlalu besar untuk dimuatkan di bagian dalam misel. Pembentukan dwilapis lipid, yang merupakan hasil dari interaksi hidrofob, adalah proses yang berlangsung cepat dan spontan dalam air. Molekul-molekul air dibebaskan dari ekor-ekor hidrokarbon lipid membran sementara ekor-ekor tadi saling bertemu di bagian dalam dwilapis yang non-polar. Selain itu, terdapat gaya tarik *van der Waals* antara ekor-ekor hidrokarbon. Gaya ini membuat ekor-ekor hidrokarbon tersusun rapat. Akhirnya, terdapat gaya tarik elektrostatik dan ikatan hidrogen antara gugus-gugus kepala polar dan molekul air.

Dengan demikian, dwilapis lipid distabilkan oleh seluruh jajaran gaya yang mengantarai interaksi molekuler dalam sistem biologi dan memiliki sifat:^{24,25}

1. Kecenderungan yang mendasar untuk meluas;

2. Kecenderungan untuk membentuk struktur tertutup sehingga tidak terdapat pinggiran dengan rantai-rantai hidrokarbon yang terpapar dan dengan demikian melingkupi suatu ruang;
3. Mampu merekat diri karena kehadiran suatu lubang dalam dwilapis lipid akan mengurangi efisiensi energi.



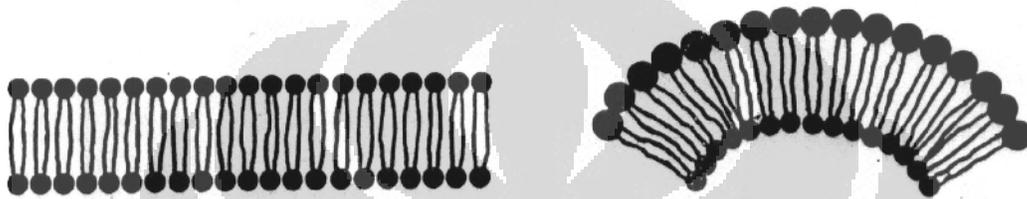
Gambar 2. Struktur Fosfolipid²⁶

Berbagai jenis fosfolipid dapat digunakan untuk membuat liposom seperti, sfingomielin dan fosfatidiletanolamin yang bermuatan netral; fosfolipid asam sebagai contoh Dipalmitoilfosfatidilgliserol (DPPG) dan Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) yang bermuatan negatif.^{15,17,23,24} Namun, jenis lipid yang paling sering digunakan dalam pembuatan liposom adalah fosfatidilkolin yang dapat diperoleh dari dari kuning telur (*Egg-yolk Phosphatidyl Choline/EPC*), otak *ox*, kedelai (*Soybean Phosphatidyl Choline /SPC*) atau yang dibuat secara sintetik. Hal ini disebabkan oleh fosfatidilkolin dapat digunakan secara luas karena memiliki muatan netral, *chemical inertness*, dan harganya lebih murah dari fosfolipid yang lain.²⁷

Jenis lipid lain yang dapat digunakan dalam pembuatan liposom adalah Tetraeter Lipid (TEL). Lipid tetra bipolar ini dapat diperoleh dari membran sel famili *Archaea* seperti, *Thermoplasma acidophilum* atau *Sulfolobus acidocaldarius*.²⁸⁻³⁰ Penelitian telah membuktikan

bahwa TEL berguna untuk meningkatkan kestabilan liposom terhadap oksidasi, suhu tinggi, dan suasana asam.³¹⁻³³

Afinitas liposom untuk berbagai jaringan/organ dapat dimodifikasi dengan cara membuat liposom yang mengandung fosfolipid dengan berbagai konfigurasi rantai asam-lemak.³ Sedangkan, dengan penambahan kolesterol pada membran liposom dapat meningkatkan stabilitas liposom dan menurunkan risiko terjadinya kebocoran zat-zat yang dibawa oleh liposom dengan cara menurunkan permeabilitas dwilapis lipid.^{15,17}



Gambar 3. Membran Liposom dengan Tetraeter Lipid²⁰

2.1.3 Klasifikasi Liposom

Berdasarkan ukurannya, liposom dapat dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu:

1. *Small Unilamellar Vesicles* (SUV)

Adalah vesikel yang diselubungi satu lapis membran dan dapat dibuat dengan metode ultrasonikasi intensitas tinggi. Vesikel ini disebut juga vesikel unilamellar tersonifikasi. Biasanya SUV memiliki diameter 25 nm.^{15,17}

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

Biasanya vesikel ini berukuran 100-200 nm dan dapat dibuat dengan ekstruksi tekanan tinggi/dialisis dengan detergen. Vesikel ini berguna dalam bidang farmasi karena dapat bertahan lebih lama dalam sirkulasi.¹⁵

3. *Large Unilamellar Vesicles* (LUV)

Adalah vesikel yang diselubungi satu lapis membran dan memiliki ukuran lebih besar dari SUV. Vesikel jenis ini dapat dibuat dengan metode injeksi eter dan fusi liposom jenis SUV dengan diinduksi Kalsium. Biasanya LUV berdiameter 500 nm.^{15,17}

Berdasarkan morfologinya, liposom dapat dibagi menjadi tiga, yaitu:^{27,33}

1. *Multi Lamellar Vesicles* (MLV)

Yang termasuk dalam MLV adalah liposom jenis apapun yang memiliki beberapa membran dwilapis lipid. Vesikel ini dapat diperoleh dengan cara mengocok fosfolipid kering dalam air sehingga disebut sebagai *hand shaken liposomes*.

2. *Multi Vesicular Liposomes* (MVL)

Adalah liposom yang diinkorporasikan dengan membran dwilapis eksternal.

3. *Small Plurilamellar Vesicles* (SPV)

Adalah vesikel yang terbentuk dari ketidaksempurnaan dalam membuat MLV dengan metode konvensional sehingga meningkatkan perbedaan osmotik pada bagian internal. Hal ini menyebabkan vesikel bersifat tak stabil.

Selain itu, liposom juga dapat dikelompokkan menjadi 3 berdasarkan fungsinya:^{27,33}

1. Liposom yang diinkorporasikan dengan target ligan seperti antibodi monoklonal (lektin, oligosakarida) yang dapat digunakan untuk target spesifik.

2. Liposom konvensional yang biasanya digunakan untuk penelitian eksperimen secara *in vitro*. Liposom ini memiliki waktu keutuhan vesikel yang pendek dan tidak stabil dalam lingkungan biologis.

3. Liposom yang secara steril stabil

Liposom ini diinkorporasikan suatu polimer hidrofilik yang dicangkokkan pada permukaan membran. Polimer tersebut mengaktifkan permukaan membran liposom dan dikenal sebagai *sterically stabilized liposomes* (*stealth*). Salah satu keuntungan *stealth liposomes* dibandingkan dengan liposom konvensional yaitu, pada pemberian obat dengan dosis yang sama, waktu paruh liposom dalam sirkulasi darah lebih panjang dan kecepatan absorpsi obat menjadi lebih baik.¹⁹

2.1.4 Metode Penentuan Ukuran Liposom^{15,27}

Besarnya diameter liposom dapat diukur dengan berbagai macam metode yang memiliki perbedaan dalam hal kompleksitas dan tingkat kerumitan. Beberapa di antaranya adalah:

1. Pengukuran dengan menggunakan *particle sizer*

Metode ini adalah metode yang paling akurat dalam ini mengukur diameter liposom. Hasil pengukuran diameter liposom dengan metode tersebut bersifat kuantitatif sehingga memiliki keakuratan dan sensitivitas yang tinggi. Selain itu, dengan metode ini juga dapat diketahui diameter rata-rata serta distribusi ukuran liposom. Sayangnya, harga *particle sizer* sangat mahal.¹²

2. Pengukuran langsung dengan menggunakan mikroskop elektron

Metode ini termasuk salah satu metode yang cukup akurat dalam mengukur diameter liposom karena metode dapat memberikan data tentang profil liposom satu persatu baik populasi liposom yang memiliki ukuran rata-rata atau di atas rata-rata. Namun, metode ini juga memiliki beberapa kekurangan seperti, membutuhkan waktu yang lama, membutuhkan suatu keterampilan khusus, dan harganya sangat mahal.²⁷

Dari beberapa tehnik yang digunakan dalam penentuan ukuran liposom dengan menggunakan mikroskop elektron, pewarnaan negatif (*negative staining*) mikroskop elektron sering digunakan sebagai tehnik dalam pengukuran diameter liposom karena dapat memberikan informasi mengenai distribusi ukuran liposom dan jenis liposom (unilamelar atau multilamelar).

3. *Quasi-elastic laser light scattering* atau spektroskopi korelasi foton

Metode ini merupakan metode yang sangat sederhana dan dapat dilakukan dalam waktu yang cepat dalam mengukur diameter liposom. Namun, metode ini tidak dapat memberikan informasi tentang profil populasi liposom yang memiliki ukuran di atas rata-rata.

Prinsip metode ini adalah analisis intensitas fluktuasi dalam *scattered laser light* yang disebabkan oleh gerak *Brownian* suatu partikel dalam solusio/suspensi. Karena partikel berukuran kecil berdifusi lebih cepat daripada partikel berukuran besar, maka kecepatan fluktuasi intensitas dari *scattered light* sangat bervariasi. Dengan metode ini, dapat diukur liposom yang memiliki diameter antara 3 nm-3 μ m.

4. Pengukuran dengan menggunakan program komputer

Dalam beberapa tahun terakhir, terdapat perkembangan yang sangat signifikan dalam menganalisis ukuran diameter liposom. Hal ini memberikan beberapa keuntungan seperti, biaya yang dibutuhkan jauh lebih murah, pengumpulan dan pengukuran distribusi ukuran liposom dapat dilakukan secara cepat dan lebih akurat. Walaupun demikian, program analisis ukuran diameter liposom masih belum dapat mengukur liposom yang bergabung atau liposom yang tidak terwarnai dengan baik.

Selain itu, dengan menggunakan program komputer dalam mengukur diameter liposom, data yang kita peroleh lebih akurat dan telah dikalibrasi. Kalibrasi dapat dilakukan dengan menggunakan skala ukur seperti, *Olympus* untuk mendapatkan referensi dalam seluruh pengukuran dan perhitungan diameter liposom.

2.1.5 Metode Pembuatan Liposom

Dua metode yang sering digunakan untuk membuat preparat liposom khususnya sebagai pembawa obat adalah sebagai berikut:²⁰

1. Metode hidrasi lipid yang diikuti dengan agitasi intensitas tinggi dengan menggunakan sonikasi atau *high-shear propeller*. Sonikasi adalah metode yang sampai saat ini paling baik digunakan untuk membuat *Small Unilamellar Vesicles* (SUV) dalam skala kecil. Metode ini adalah salah satu pemberi energi tertinggi terhadap dispersi lipid dan langsung dapat diaplikasikan ke *Multilamellar Vesicles* (MUV) untuk diubah menjadi SUV.²⁷
2. Metode lainnya adalah dengan cara pertama-tama melarutkan fosfolipid dalam larutan organik dan selanjutnya ditambahkan ke dalam media *aqueous* dengan diikuti agitasi. Setelah itu, larutan organik dipisahkan dari fosfolipid dalam keadaan hampa udara yang akan menghasilkan emulsi/dispersi liposom.

2.1.6 Konsep Liposom sebagai Pembawa Obat

Dua hal terpenting dari liposom sebagai sistem pembawa obat adalah stabilitas membran dan ukuran liposom karena menentukan lamanya liposom dapat berada dalam sirkulasi dan interaksi dengan sistem biologi di dalam tubuh adalah:^{19,20, 23}

2.1.6.1 Ukuran Liposom

Besarnya ukuran liposom tergantung dari beberapa hal seperti, metode pembuatan, komposisi lipid yang menyusunnya, serta keseimbangan antara energi untuk membuka membran liposom, elastisitas kelengkungan liposom dan jumlah energi yang tersebar. Ukuran rata-rata dan distribusi ukuran vesikel sangat penting sebagai parameter untuk komponen fisik, sifat biologi, dan jenis substansi yang dapat dibawa oleh liposom secara *in vivo*.²³

Dalam aplikasinya sebagai pembawa obat, ukuran liposom yang ideal untuk digunakan adalah antara 200-1500 nm. Bila ukuran liposom di bawah 200 nm, akan menyebabkan materi yang dibawanya mudah untuk terjadi kebocoran.²⁰

Liposom sebagai pembawa obat, dapat diberikan secara intravena, intramuskular, intraperitoneal, dan oral.³ Akan tetapi, pemberian liposom secara intravena adalah yang paling baik. Waktu paruh liposom di dalam sistem pembuluh darah dapat diukur dalam beberapa menit s.d. jam tergantung ukuran dan komposisi lipid yang menyusunnya.

Bila liposom kecil (ukuran diameter 100-1000 nm) diberikan secara intravena, maka akan langsung diambil oleh sistem retikuloendotelial.³¹ Hal ini berguna untuk mengantarkan materi seperti, obat yang dibawa oleh liposom tersebut kepada makrofag. Setelah difagositosis oleh makrofag, barulah materi tersebut dapat dikeluarkan dari liposom. Bila liposom berukuran diameter lebih dari 3000 nm diberikan secara intravena, maka akan langsung disimpan dalam paru-paru.³²

2.6.1.2 Stabilitas Membran

Yang termasuk dalam stabilitas membran adalah permeabilitas, fluiditas, dan fusigenitas. Kestabilan membran liposom tergantung jenis lipid yang digunakan dan dapat ditentukan secara fisika, kimia, dan biologi.³³

Pada saat liposom berada dalam sistem pembuluh darah, liposom mungkin rentan menjadi tidak stabil karena efek destabilisasi oleh protein serum. Hal ini dapat menyebabkan hilangnya materi yang dibawa oleh liposom khususnya yang bersifat larut dalam air. Selain itu, lipoprotein berdensitas tinggi (*High Density Lipoprotein*, HDL) dapat menembus lapisan dwilapis liposom yang tak stabil dan menyebabkan hilangnya fosfolipid yang menyusun membran liposom contohnya, fosfatidilkolin karena telah digantikan oleh HDL. Kehilangan fosfolipid dapat dicegah dengan menginkorporasikan kolesterol ke dalam membran liposom.

Kolesterol dapat meningkatkan stabilitas liposom dengan cara merusakkan lipoprotein yang masuk ke dalam membran liposom.³⁴

Selain itu, sebagai pembawa obat, perubahan muatan l liposom dapat mempengaruhi distribusinya dalam tubuh seperti,³

1. Vesikel liposom yang bermuatan negatif dapat memasuki sel dengan cara fusi. Bila liposom tersebut digunakan sebagai sistem pembawa obat, maka obat yang dibawa akan menjadi tak bermuatan pada saat memasuki sitoplasma sel.
2. Vesikel liposom yang bermuatan netral memasuki sel dengan cara fagositosis. Hal ini menyebabkan obat yang dibawa terekspos dengan sistem hidrolitik lisosomal dari sel.
3. Vesikel liposom yang bermuatan positif dan netral didegradasi lebih lama daripada vesikel yang bermuatan negatif.

2.2 Tetraeter Lipid (TEL)

Membran liposom dapat dibuat dari berbagai macam lipid. Salah satu di antaranya adalah tetraeter lipid yang saat ini terus dikembangkan oleh para peneliti. Tetraeter lipid (TEL) dapat berasal dari hasil ekstraksi *Sulfolobus acidocaldarius* atau *Thermoplasma acidophilum*.²⁸⁻³²

2.2.1 *Thermoplasma acidophilum*

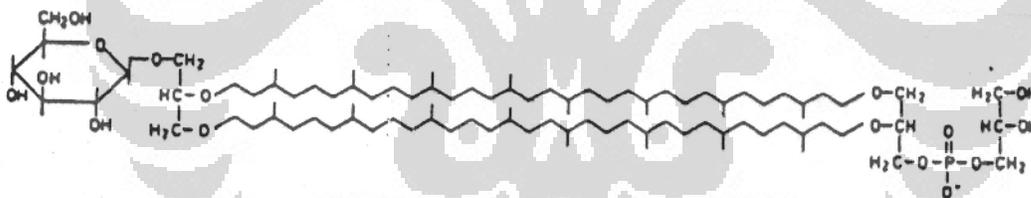
Thermoplasma acidophilum (*Th. acidophilum*) adalah *archaeon* termoasidofilik yang pertama kali diisolasi oleh Darland, et al dan dapat hidup pada suhu 56°C dan keadaan asam (pH 1-2).³⁵⁻³⁶ Karena spesies dari genus *Thermoplasma* memiliki dinding sel yang utuh, maka dapat dipastikan bahwa membran sitoplasmanya sangat resisten terhadap pH asam. Dalam laboratorium, pertumbuhan optimum *Th. acidophilum* adalah pada suhu 59°C dan pH 2 dalam asam sulfur yang mengandung medium *Freund*.³⁵⁻³⁷

Lipid *archaeal* adalah gliserol eter di mana hanya pada fosfat (bila ada) yang dihubungkan melalui ikatan ester. Lipid ini tidak mengandung ikatan rangkap sehingga meningkatkan stabilitas lipid terhadap oksidasi, memiliki gugus samping metil, dan membentuk pentasiklik di dalam rantai hidrokarbon. Bila terjadi peningkatan temperatur dalam lingkungan asam, ikatan eter yang dimiliki lipid ini akan membuat lipid tersebut resisten terhadap hidrolisis.³⁵

Membran lipid dari *Th. acidophilum* terdiri dari *dibiphytanyl tetraether macrocycle* dengan 72 atom yang tersusun dalam suatu rangkaian. Berdasarkan Langworthy,²⁸ dalam kedua rantai *biphytanyl*, akan terbentuk pentasiklik simetris dengan jumlah sampai 2 pentasiklik/rantai dan dalam bentuk paralel seiring dengan peningkatan temperatur dari 39-59°C. Hal ini membuat jarak dua molekul gliserol bertambah 3-4 nm terhadap bagian hidrofobik dan menyebabkan dimensi tetraeter lipid cukup untuk membuat lapisan tunggal (*monolayer*).³⁵

Liposom yang mengandung TEL dapat bertahan pada suhu 37°C dan suhu 4-8°C. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh dr. Bethge dengan hewan percobaan tikus menunjukkan bahwa penggunaan liposom yang mengandung TEL sebagai pembawa obat tidak bersifat sitotoksik atau mutagenik.³⁵ Tetraeter lipid dari *Th. acidophilum* juga akan mempertahankan liposom agar tetap stabil dalam ukuran di bawah 100 nm.

Stabilitas liposom yang mengandung TEL lebih tinggi pada pH rendah daripada pH netral atau tinggi (pH alkali). Hal tersebut tidak tergantung metode pembuatan liposom karena semua liposom yang mengandung TEL dengan metode pembuatan yang berbeda-beda terbukti stabil pada keadaan asam (pH 3-4).³⁸



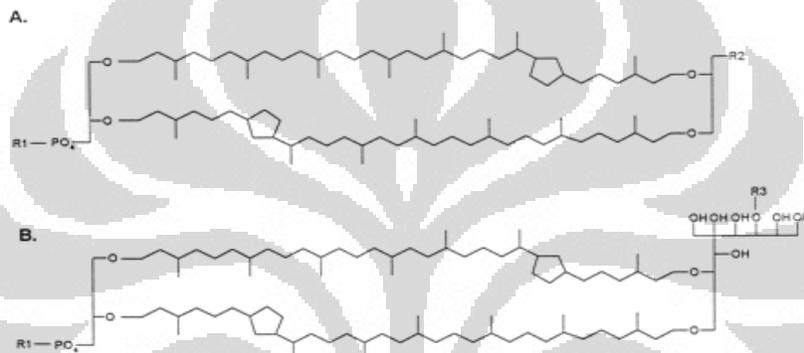
Gambar 4. Struktur Tetraeter Lipid (TEL) pada *Thermoplasma acidophilum*³⁸

2.2.2 *Sulfolobus acidocaldarius*

Sulfolobus acidocaldarius normally tumbuh pada iklim panas, yaitu dengan temperatur antara 65-80°C dan pada pH 2-3. Komponen utama dari membran plasma *S. acidocaldarius* adalah tetraeter lipid bipolar yang menyusun 90% membran plasma.²⁸⁻³⁰ Penyusun utama tetraeter lipid bipolar adalah fraksi E lipid polar (PLFE). Fraksi E lipid polar mengandung

campuran tetraeter lipid dengan struktur tetraeter dialkilnonitolgliserol (*Glycerol Dialkylnonitol Tetraether*, GDNT) atau tetraeter dialkylgliserolgliserol (*Glycerol Dialkylglycerol Tetraether*, GDGT).³⁹

Tetraeter dialkilnonitol gliserol mengandung fosfatidilmioinositol pada salah satu ujungnya dan β -glukosa pada ujung yang lain. Sedangkan, tetraeter dialkilgliserol gliserol memiliki fosfatidilmioinositol yang dilekatkan ke satu gliserol dan β -D-galaktosil-D-glukosa yang melekat ke struktur lainnya. Baik GDNT dan GDGT memiliki satu pasang rantai 40-karbon fitanil hidrokarbon. Setiap rantai bifitanil terdiri dari 4 cincin siklopentana yang akan meningkat jumlahnya seiring dengan peningkatan temperatur.⁴⁰



Gambar 5. Struktur Fraksi E Lipid Polar (PLFE)⁴⁰

Dalam media cair, PLFE akan membentuk liposom unilamelar dan multilamelar yang stabil. Penelitian dengan menggunakan *differential scanning calorimetric* menunjukkan bahwa liposom PLFE memiliki stabilitas yang baik pada suhu tinggi. Hal ini disebabkan oleh PLFE memiliki muatan negatif pada permukaannya dan menyebabkan membran liposom menjadi rapat dan *rigid*.⁴¹ Hal tersebut menjelaskan mengapa *S. acidocaldarius* dapat tumbuh dalam temperatur tinggi dan hidup dalam lingkungan asam dengan kompartemen internal yang dipertahankan dalam pH 6,5.

2.3 Egg-yolk Phosphatidyl Choline (EPC)

Tingkat kejenuhan fosfatidil kolin yang menyusun membran liposom mempengaruhi kestabilan dan kerentanannya terhadap oksidasi selama penyimpanan.⁴² Lipid yang mengandung

rantai jenuh atau tidak memiliki ikatan rangkap seperti yang dimiliki fosfatidil kolin kuning telur, cenderung lebih stabil karena lebih resisten terhadap oksidasi.

Bila membran liposom disusun oleh fosfatidilkolin kuning telur ditambahkan TEL, maka TEL akan memberikan muatan negatif kepada liposom tersebut dan juga menghubungkan permukaan membran dwilapis (*bilayer*) secara kovalen sehingga liposom akan lebih stabil baik dalam hal struktur maupun elektrostatik.³⁵

2.4 Garam Fisiologis: Kalsium Klorida

Kalsium klorida atau yang sering dikenal dengan nama CaCl_2 , adalah senyawa ionik yang terdiri dari ion Kalsium (Ca^{2+}) dan klorida (Cl^-). Senyawa ini sangat larut dalam air. Senyawa ini merupakan garam berbentuk padat bila dalam suhu ruangan, yaitu sekitar 25°C .⁵⁸ Ion Kalsium (Ca^{2+}) bersama dengan ion kalium (K^+) dan natrium (Na^+) berperan dalam transmisi saraf, pengaturan enzim dan kontraksi otot.⁴³

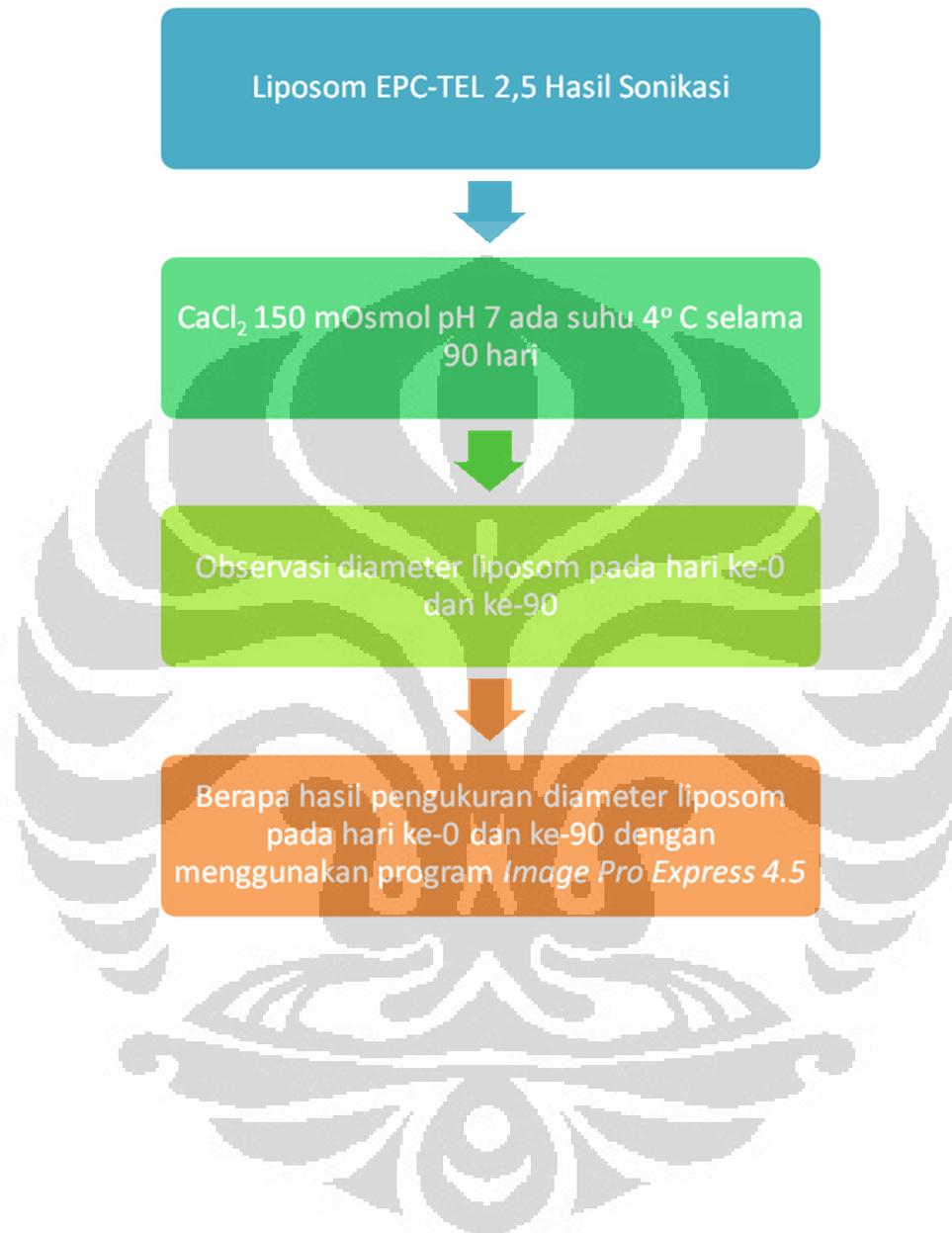
Beberapa kegunaan Kalsium klorida dalam bidang kedokteran adalah sebagai berikut:

1. Terapi intravena untuk tatalaksana hipokalsemia dan membantu menurunkan jumlah tinggi kalium serum pada hiperkalemi.
2. Tatalaksana toksisitas obat *Calcium Channel Blocker*.
3. Bentuk cair Kalsium klorida dapat digunakan dalam transformasi genetik oleh sel dengan meningkatkan permeabilitas membran, menginduksi kemampuan dalam pengambilan DNA sehingga memungkinkan fragmen DNA memasuki sel lebih cepat.⁴⁴

2.5 Program *Image Pro Express 4.5*

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* dengan kemampuan mengintegrasikan teks, data, dan grafik dalam satu paket sehingga memudahkan pengerjaan penghitungan ukuran liposom secara akurat. Selain itu, *Image Pro Express 4.5* juga dapat memproses gambar dengan cepat sehingga tidak membutuhkan waktu yang lama.^{13,14}

2.6 Kerangka Konsep



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain

Penelitian ini menggunakan desain penelitian deskriptif yang mengukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 selama penyimpanan 90 hari pada suhu 4°C yang telah dibuat oleh kelompok penelitian sebelumnya, Rachmawati¹¹ dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5*.

3.2. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran dan Fisika Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia selama bulan Juli s.d. September 2008.

3.3. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah hasil dokumentasi dalam bentuk foto liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 selama penyimpanan 90 hari pada suhu 4°C . Hasil dokumentasi tersebut didapatkan dari penelitian Rachmawati¹¹ yang diambil dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x yang dihubungkan ke kamera Sony CCD-IRIS *color video camera* di Departemen Fisika Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, pada bulan April-Juli 2007.

Sampel penelitian diambil dari hasil dokumentasi berupa foto liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dan hari ke-90 (masing-masing sebanyak 16 buah foto pada 16 lapang pandang).

3.4. Besar Sampel

Penelitian ini merupakan penelitian mengenai pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dan hari ke-90 dengan jumlah kelompok perlakuan dalam penelitian adalah 2(dua), yaitu:

1. Kelompok perlakuan 1: pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0.

2. Kelompok perlakuan 2: pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-90.

Jumlah sampel dalam penelitian ini dihitung berdasarkan jumlah kelompok perlakuan dalam penelitian ini. Karena terdapat 2 (dua) kelompok, maka berdasarkan rumus Federer jumlah sampel minimal adalah:⁴⁵

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

Keterangan:

n = jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t = jumlah kelompok perlakuan

t = 2, maka didapatkan:

$$(n-1)(2-1) \geq 15$$

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

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

$$n \geq 16$$

Dari perhitungan di atas didapatkan besar sampel minimal yang digunakan dalam penelitian ini adalah 16 (enam belas) foto untuk setiap kelompok perlakuan.

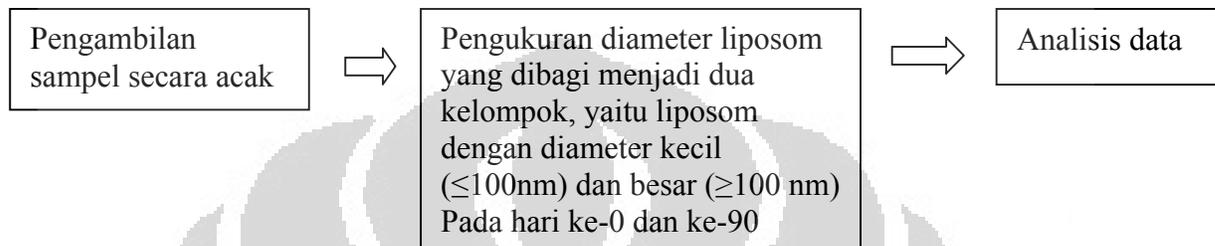
3.5. Cara Pengambilan Sampel⁴⁶

Dari hasil uji normalitas dengan menggunakan uji kemaknaan *Shapiro Wilk* untuk jumlah data ≤ 50 dan uji kemaknaan *Kolmogorov-Smirnov* untuk jumlah data ≥ 50 terhadap distribusi data hasil pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dan hari ke-90 yang didapatkan dari hasil dokumentasi penelitian Rachmawati¹¹, diketahui bahwa sampel memiliki distribusi normal ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa sampel yang digunakan mewakili populasi yang diteliti.⁴⁵

Pengambilan sampel dilakukan secara *probability sampling* karena jumlah populasi yang diteliti dan diketahui secara tepat hanya dalam jumlah kecil. Teknik pengambilan sampel menggunakan teknik pengundian pada masing-masing perlakuan yang akan diteliti. Cara

pengundiannya adalah dilakukan penomoran pada masing-masing populasi dan secara acak dilakukan pengambilan nomor berapa saja populasi yang akan dijadikan sampel (sesuai dengan perhitungan jumlah sampel yang diperlukan).

3.6. Alur Penelitian



3.7. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Satu set komputer.
2. Program *Image Pro Express 4.5*.
3. Skala *Olympus* 100 nm diambil fotonya dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x yang dihubungkan ke kamera Sony CCD-IRIS *color video camera* dan disimpan dalam format “jpeg”.

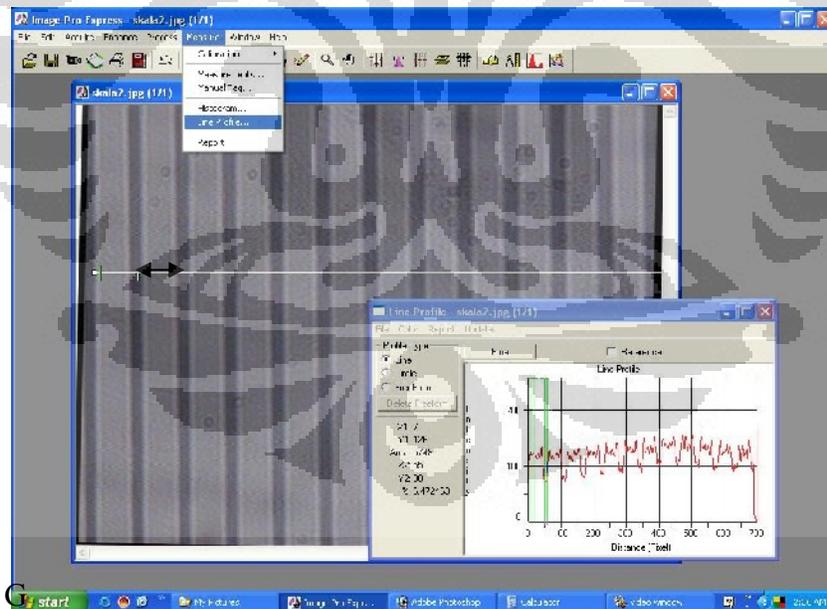
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Hasil dokumentasi dalam bentuk foto liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dan ke-90 (masing-masing sebanyak 16 buah foto yang diambil pada 16 lapang pandang berbeda). Hasil dokumentasi tersebut didapatkan dari penelitian Rachmawati¹¹ yang diambil dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x yang dihubungkan ke kamera Sony CCD-IRIS *color video camera*.

3.8. Cara Kerja

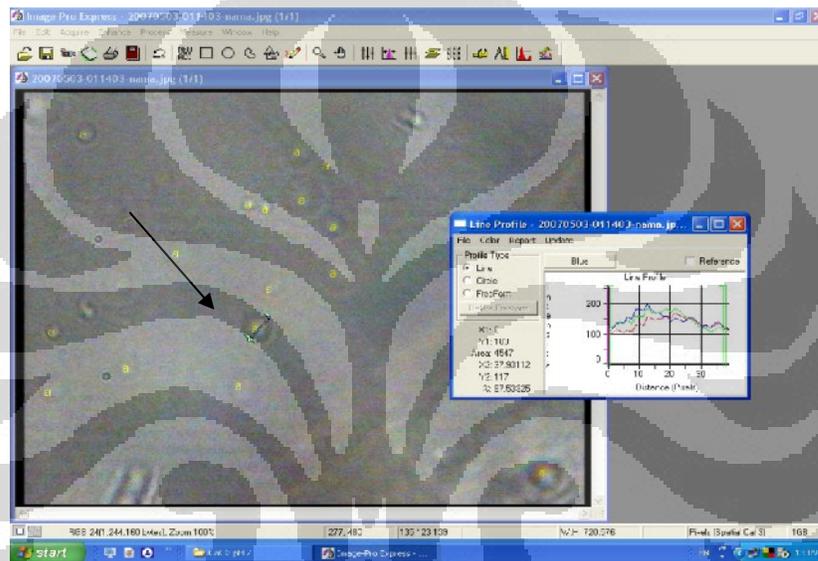
Pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi yang terpajan larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dan ke-90 dilakukan menggunakan Program *Image Pro Express 4.5* dengan penjelasan sebagai berikut:⁴⁷

1. Skala ukur *Olympus* 100 nm diambil fotonya dengan perbesaran 400x dan disimpan dalam format “jpeg”. Daerah di antara dua strip kecil adalah 100 nm. Foto skala ukur *Olympus* tersebut dibuka dalam program *Image Pro Express 4.5* dengan cara klik menu *File*→*Open*.
2. Klik menu *measure* untuk kalibrasi dan pilih *each area*. Setelah itu, pilih pada submenu *line profile* yang akan memperlihatkan ukuran masing-masing area dalam *pixel*. Kalibrasikan minimal dua area dengan masing-masing dilakukan pengukuran dua kali. Dalam mengkalibrasikan setiap area, perhatikan variabel X0 dan X2 pada kotak *line profile*. Pastikan variabel X0 selalu dalam nilai 0 *pixel*. Nilai pada variabel X2 pada kotak *line profile* adalah ukuran area yang diukur dalam *pixel*.



Gambar 6. Skala *Olympus* dengan Pembesaran 400x. Daerah di antara dua strip adalah 100 nm yang diperlihatkan dalam ukuran *pixel*.

3. Gambar liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 pada hari ke-0 dan ke-90 diukur diameternya dengan cara yang sama seperti, pengukuran skala ukur *Olympus* 100 nm. Namun, dilakukan dua kali pengukuran diameter liposom dengan cara berbeda (lihat Gambar 7 dan 8). Data yang diukur adalah data diambil dari 5 buah sampel (5 foto dengan 5 lapang pandang berbeda) dari setiap perlakuan. Dari setiap foto, dihitung jumlah liposom kecil (minimal 10 buah) dan semua liposom besar.



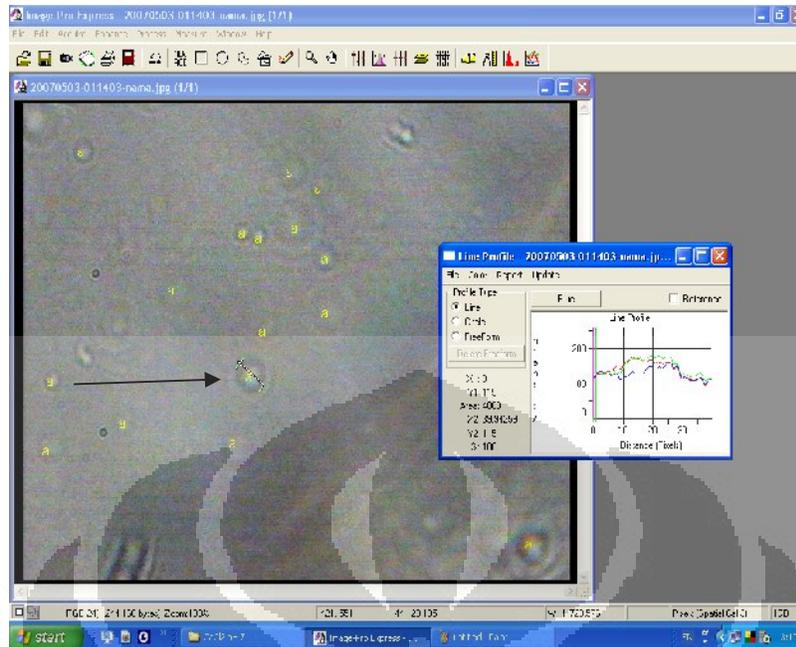
Gambar 7. Cara Pengukuran I Diameter Liposom dengan *Image Pro Express 4.5* dengan Pembesaran 400x. Pada kotak *line profile*, X0 harus bernilai nol dan X2 adalah diameter liposom yang diukur dalam *pixel*.

4. Setelah itu, dua hasil pengukuran diameter liposom (dalam *pixel*) yang telah didapatkan dihitung dengan rumus:⁴⁷

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

Keterangan:

X3 = Hasil rata-rata dari dua kali pengukuran diameter liposom X1 dan X2 dengan Menggunakan Program *Image Pro Express 4.5*.



Gambar 8. Cara Pengukuran II Diameter Liposom dengan Menggunakan Program *Image Pro Express 4.5*. dengan Pembesaran 400x Pada kotak *line profile*, X0 harus bernilai nol dan X2 adalah diameter liposom dalam *pixel*.

3.9 Definisi Operasional

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

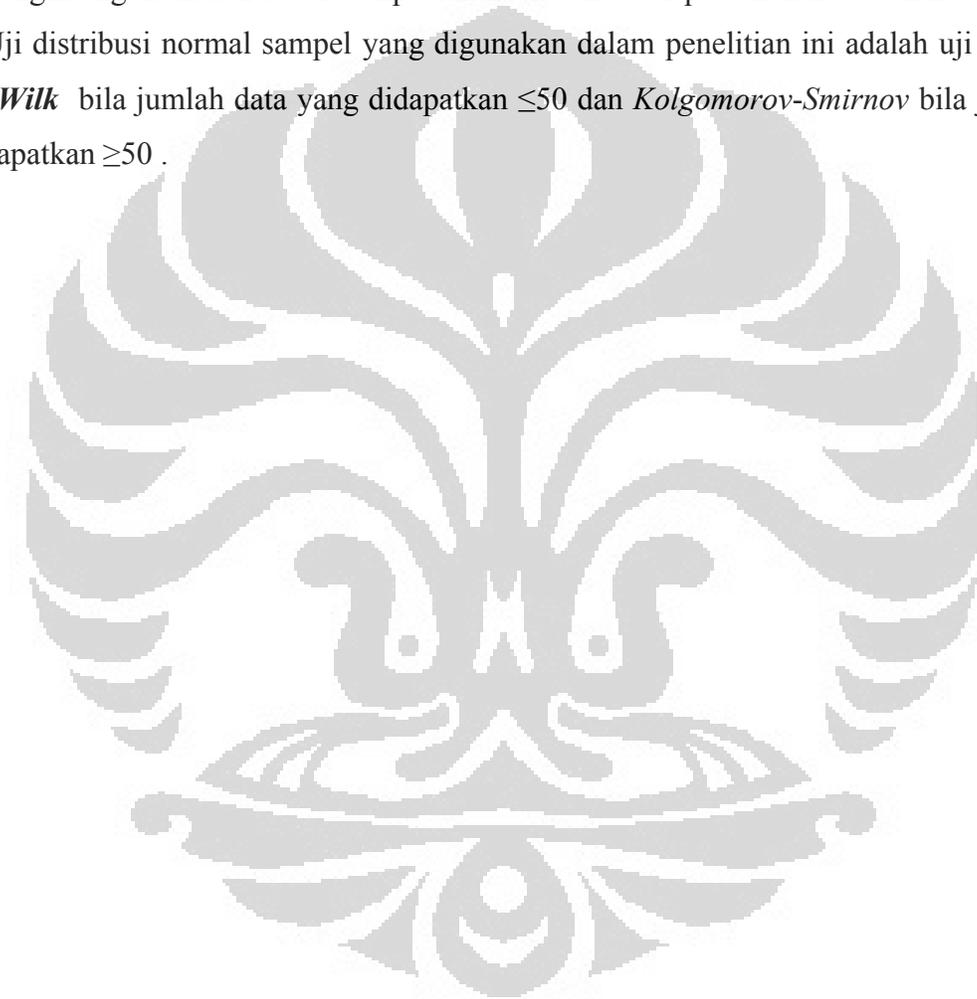
1. Tetraeter Lipid (TEL) adalah suatu jenis lipid hasil ekstraksi membran dari Archaea.²⁸⁻³⁰ Tetraeter Lipid yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari *Thermoplasma acidophilum*.
2. Liposom EPC-TEL 2,5 adalah liposom yang dibuat dari kombinasi lesitin/fosfatidil kolin kuning telur (*Egg-yolk Phosphatidyl-Choline/EPC*) dan TEL 2,5 mol %.¹⁹
3. Sonikasi adalah metode dengan menggunakan gelombang suara dengan intensitas sangat tinggi untuk membuat liposom yang memiliki ukuran kecil dan hanya diselubungi satu lapis membran.¹⁵
4. Sebuah liposom dikategorikan berukuran besar bila memiliki diameter ≥ 100 nm dan berukuran kecil bila memiliki diameter ≤ 100 nm .¹¹

3.10. Analisis Data

Analisis statistik terhadap data kuantitatif yang didapatkan dalam penelitian ini menggunakan uji statistik deskriptif dengan menggunakan program SPSS 11.5 dengan parameter sebagai berikut:

1. Pengukuran diameter liposom dan mengklasifikasikannya ke dalam liposom kecil dan besar pada hari ke-0 dan ke-90.
2. Penghitungan ukuran rata-rata liposom kecil dan besar pada hari ke-0 dan ke-90.

Uji distribusi normal sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji kemaknaan *Shapiro Wilk* bila jumlah data yang didapatkan ≤ 50 dan *Kolgomorov-Smirnov* bila jumlah data yang didapatkan ≥ 50 .



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Berdasarkan perhitungan besar sampel dengan menggunakan rumus Federer, didapatkan bahwa besar sampel minimal yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 16 (enam belas) buah foto, tetapi dalam penelitian ini hanya digunakan sampel sebanyak 4 (empat) buah foto untuk masing-masing perlakuan. Hal ini menyebabkan hasil yang didapatkan dalam penelitian ini tidak dapat dijadikan sebagai acuan untuk mengambil suatu kesimpulan secara umum.

Diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dan ke-90 (ukuran nm) didapatkan dari hasil pembagian rata-rata dua kali pengukuran diameter liposom (*pixel*) dengan pengukuran skala *Olympus* 100 nm (*pixel*) dan dikalikan dengan 100 nm.⁴⁷

Hasil pengukuran skala *Olympus* 100 nm yang digunakan sebagai standar pengukuran diameter liposom pada hari ke-0 dan ke-90 dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Skala *Olympus* dengan Menggunakan Program *Image Pro Express 4.5*.

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

Hasil pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2,5 yang terpajan larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5* dapat dilihat dalam Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Dalam Larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 suhu 4 °C pada Hari ke-0

Liposom dalam CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 suhu 4 °C Hari ke-0	Liposom Kecil	Liposom Besar
Ukuran Diameter Liposom Terkecil (nm)	42,57	100,64
Ukuran Diameter Liposom Terbesar (nm)	99,01	121,89

Berdasarkan data yang telah didapatkan (lihat Tabel 3 dan 4), ukuran rata-rata diameter liposom EPC-TEL 2,5 yang termasuk kategori liposom besar (≥ 100 nm) pada hari ke-0 dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5* (berurutan dari kecil ke besar) adalah 49,99; 52,01; 54,36; 54,38 (dalam ukuran *pixel*). Dengan menggunakan rumus yang telah dijelaskan di atas, maka ukuran rata-rata diameter liposom sebenarnya adalah 106,37; 110,67; 115,66; 115,70 (dalam ukuran nm).

Tabel 3. Rata-Rata Ukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Ukuran Besar (≥ 100 nm) Dalam Larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 suhu 4 °C pada Hari ke-0

CaCl ₂ 150 mOsmol suhu 4 °C pH 7 Hari ke-0	Pengukuran Diameter Liposom (<i>pixel</i>) Rata-Rata	Ukuran Standar Skala <i>Olympus</i>	Diameter Liposom (nm)
Foto 1	54,36	47 <i>pixel</i> /100nm	115,66
Foto 2	49,99	47 <i>pixel</i> /100nm	106,37
Foto 3	54,38	47 <i>pixel</i> /100nm	115,70
Foto 4	52,01	47 <i>pixel</i> /100nm	110,67
Rata-Rata Seluruhnya	52,67	47 <i>pixel</i> /100nm	112,09

Di sisi lain, untuk liposom kecil (≤ 100 nm) , hasil pengukuran untuk diameter rata-ratanya (berurutan dari kecil ke besar) adalah 33,37; 33,78; 34,04; 37,81 (dalam ukuran *pixel*) yang memiliki ukuran sebenarnya, yaitu 70,99; 72,31; 72,42; 80,45 (dalam ukuran nm).

Tabel 4. Rata-Rata Ukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Ukuran Kecil (≤ 100 nm) Dalam Larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pada Hari ke-0

CaCl ₂ 150 mOsmol suhu $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pH 7 Hari ke-0	Pengukuran Diameter Liposom (<i>pixel</i>) Rata-Rata	Ukuran Standar Skala <i>Olympus</i>	Diameter Liposom (nm)
Foto 1	34,04	47 <i>pixel</i> /100nm	72,42
Foto 2	37,81	47 <i>pixel</i> /100nm	80,45
Foto 3	33,37	47 <i>pixel</i> /100nm	70,99
Foto 4	33,78	47 <i>pixel</i> /100nm	72,31
Rata-Rata Seluruhnya	34,75	47 <i>pixel</i> /100nm	73,94

Hasil pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2,5 yang terpajan larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pada hari ke-90 dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5* dapat dilihat dalam Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengukuran Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Dalam Larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pada Hari ke-90

Liposom dalam CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu $4 \text{ }^\circ\text{C}$ Hari ke-90	Liposom Kecil	Liposom Besar
Ukuran Diameter Liposom Terkecil (nm)	40	106,8
Ukuran Diameter Liposom Terbesar (nm)	99,0	154,2

Berdasarkan data yang telah didapatkan (lihat Tabel 6 dan 7), ukuran rata-rata diameter liposom EPC-TEL 2,5 yang termasuk kategori liposom besar (≥ 100 nm) pada hari ke-90 dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5* (berurutan dari kecil ke besar) adalah 53,38; 57,28; 57,70; 60,92 (dalam ukuran *pixel*). Dengan menggunakan rumus yang telah dijelaskan di atas, maka ukuran rata-rata diameter liposom sebenarnya adalah 113,56; 121,87; 122,78; 129,62 (dalam ukuran nm).

Di sisi lain, untuk liposom kecil (≤ 100 nm), hasil pengukuran untuk diameter rata-ratanya (berurutan dari kecil ke besar) adalah 26,11; 28,68; 34,14; 36,13 (dalam ukuran *pixel*) yang memiliki ukuran sebenarnya, yaitu 55,56; 61,02; 72,64; 76,87 (dalam ukuran nm).

Tabel 6. Rata-Rata Ukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Ukuran Besar (≥ 100 nm) Dalam Larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu $4 \square \text{C}$ pada Hari ke--90

CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 suhu $4 \square \text{C}$ Hari ke-90	Pengukuran Diameter Liposom (<i>pixel</i>) Rata-Rata	Ukuran Standar Skala <i>Olympus</i>	Diameter Liposom (nm)
Foto 1	53,38	47 <i>pixel</i> /100nm	113,56
Foto 2	57,70	47 <i>pixel</i> /100nm	122,78
Foto 3	60,92	47 <i>pixel</i> /100nm	129,62
Foto 4	57,28	47 <i>pixel</i> /100nm	121,87
Rata-Rata Seluruhnya	57,32	47 <i>pixel</i> /100nm	121,96

Tabel 7. Rata-Rata Ukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Ukuran Kecil (≤ 100 nm) Dalam Larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu $4 \square \text{C}$ pada Hari ke--90

CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 suhu $4 \square \text{C}$ Hari ke-90	Pengukuran Diameter Liposom (<i>pixel</i>) Rata-Rata	Ukuran Standar Skala <i>Olympus</i>	Diameter Liposom (nm)
Foto 1	26,11	47 <i>pixel</i> /100nm	55,56
Foto 2	36,13	47 <i>pixel</i> /100nm	76,87
Foto 3	28,68	47 <i>pixel</i> /100nm	61,02
Foto 4	34,14	47 <i>pixel</i> /100nm	72,64
Rata-Rata Seluruhnya	31,27	47 <i>pixel</i> /100nm	66,52

Penelitian ini juga pernah dilakukan sebelumnya yang melakukan pengukuran diameter liposom yang terdiri atas TEL saja dan kombinasi TEL dan lesitin telur (EPC-TEL 2,5) dengan menggunakan *particle seizer*. Hasil penelitian tersebut membuktikan bahwa TEL cukup stabil pada pH rendah dibandingkan pada pH netral ataupun alkalis yaitu selama 109 minggu pada suhu $4-8^\circ \text{C}$ dan 10 minggu pada suhu 100°C .⁴⁸

Penelitian lainnya mengenai stabilitas liposom yang hanya terdiri atas TEL saja menunjukkan bahwa TEL cukup stabil pada pH rendah dibandingkan pada pH netral ataupun alkalis yaitu selama 109 minggu pada suhu $4-8^\circ \text{C}$ dan 10 minggu pada suhu 100°C . Kombinasi TEL dan lesitin telur dari berbagai rasio yaitu 75:25; 50:50 ataupun 25:75 menunjukkan kestabilan yang cukup tinggi hingga hari ke 622 pada suhu $4-8^\circ \text{C}$. Uji stabilitas liposom TEL

diukur berdasarkan ukuran partikel dengan menggunakan *particle seizer* dan uji penglepasan karboksifluoresens dari membran liposom.⁴⁸

Dari hasil pengukuran diameter liposom (kecil maupun besar) EPC-TEL 2,5 yang terpajan larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu $4 \pm 0,5$ °C selama 90 hari di atas dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5* dapat diambil kesimpulan bahwa program tersebut dapat mengukur diameter liposom secara kuantitatif, yaitu dalam bentuk data numerik.

Walaupun pada hasil pengukuran didapatkan adanya perubahan diameter liposom pada hari ke-0 dan ke-90, tetapi hasil tersebut tidak dibandingkan karena tujuan penelitian ini hanya mengukur diameter liposom pada hari ke-0 dan ke-90 tanpa membandingkannya.

Pengukuran diameter liposom dengan menggunakan program *Image Pro Express 4.5* masih memiliki beberapa kelemahan seperti, besarnya pengaruh gerak *Brownian* liposom pada pengukuran diameter liposom sehingga distribusi ukuran diameter liposom cenderung sangat luas. Pengukuran diameter liposom dengan program *Image Pro Express 4.5* juga memerlukan waktu yang cukup lama (secara manual).

Pada penelitian ini, terdapat beberapa kelemahan seperti, jumlah sampel yang digunakan tidak sesuai dengan hasil perhitungan besar sampel dengan menggunakan rumus Federer walaupun tidak akan dibandingkan antara diameter liposom hari ke-0 dengan hari ke-90.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Program *Image Pro Express 4.5* dapat digunakan untuk mengukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi berukuran besar maupun kecil dengan pemaparan garam Kalsium klorida (CaCl_2) 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dan 90 secara kuantitatif, yaitu menghasilkan hasil pengukuran diameter liposom ke dalam data numerik seperti, 115,67 nm atau 42,57 nm.
2. Ukuran rata-rata diameter liposom EPC-TEL 2,5 kategori besar (≥ 100 nm) dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dan hari ke-90 adalah 112,09 nm dan 121,96 nm.
3. Ukuran rata-rata diameter liposom EPC-TEL 2,5 kategori kecil (≤ 100 nm) dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada hari ke-0 dan hari ke-90 adalah 73,94 nm dan 66,52 nm.

5.2 Saran

1. Program *Image Pro Express 4.5* dapat dijadikan salah satu metode alternatif untuk mengukur diameter liposom secara kuantitatif. Selain itu, program ini juga memiliki keakuratan yang baik dan lebih hemat dari segi biaya operasional daripada dengan menggunakan *particle seizer* dan dapat menunjang akurasi penelitian mengenai uji stabilitas liposom secara kimia dan fisika.
2. Dilakukan penelitian kembali dengan menggunakan besar sampel minimal yang sesuai dengan hasil perhitungan menggunakan rumus Federer.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jufri M. Arah dan perkembangan liposom: drugs delivery systems. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2004; I(2): 59-68.
2. Papahadjopoulos D. Steric stabilization. In: Andrew S. Janoff (ed). *Liposomes: Rational Design*. Informa Health Care. 1998: 1-12.
3. Ranade VV, Hollinger MA. *Drug Delivery Systems*. 2nd edition. CRC Press. 2003:1-14.
4. Lasic DD (ed). Chemistry of lipids and liposomes. In: *Liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993: 1-42
5. 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.
6. Storm G, Crommelin DJA. Liposomes: Quo vadis?. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1. 1998:19-31.
7. Freisleben HJ, Neisser C, Hartmann M, Rudolph P, Geck P, Ring K, Müller WEG. Influence of the main phospholipid (MPL) from *Thermoplasma acidophilum* and of liposomes from MPL on living cells: cytotoxicity and mutagenicity. *J Liposome Res* 1993;3(3):817-33.
8. Freisleben HJ, Bormann J, Litzinger DC, Lehr F, Rudolph P, Schatton W, Huang L. Toxicity and biodistribution of liposomes of the main phospholipid from the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum* in mice. *J Liposome Res* 1995;5(1):215-23.
9. Purwaningsih EH, Freisleben HJ, M. Sadikin. 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.
10. Marlina 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.
11. Rachmawati Y. Uji stabilitas kimia terhadap formulasi terbaru liposom tetraetil lipid (EPC-TEL 2,5) sebagai pembawa obat dalam larutan larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 suhu 4 °C selama 90 hari. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2008.
12. (Anonim). Particle Sizer Analysis. Diunduh dari: http://www.nalresearch.com/NetRef_ParticleSizer.html. [25 Juli 2008]
13. (Anonim). Image Pro Express. Diunduh dari: www.i-cubeinc.com/pdf/software/MCY-IPE.pdf [10 Agustus 2008]
14. (Anonim). Image Pro Express. Diunduh dari: www.mediacy.com/index.aspx?page=IPE [10 Agustus 2008]
15. Lasic DD (ed). Preparation of Liposomes. In: *Liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993: 63-107.

16. Best M and Friedrich. Liposome-forming Compositions. 2006. Diunduh dari : <http://www.freshpatents.com/liposom-forming-compositions-dt200608> [10 Agustus 2008]
17. Gregoriadis G. Liposomes in Therapeutic and Preventive Medicine. The Development of Drug Carrier Concept. *Ann NY Acad Sci.* 1978; 308,343
18. Mishina EV, Binder J, Kupiec-Weglinski JW, Jusko WJ. Effect of liposomal methylprednisolone on heart allograft survival and immune function in rats. *J Pharm Exp Ther* 1994;271(2):868-74.
19. Purwaningsih EH. Preparing liposomal-methylprednisolone at different composition of lipids. May 2000. *Unpublished.*
20. Lasic DD.(ed). Liposomes as a drug delivery system. In: *Liposomes from Physics to Application.* Elsevier Science Publisher BV 1993: p.265-324.
21. Lasic DD. Liposomes. *Science and Medicine* 1996 (May-June): 34-43.
22. Crommelin DJA, Bos GW, Storm G. Liposomes: Successful Carrier Systems for Targeted Delivery of Drugs. In: *The Drug Delivery Companies Report Autumn/Winter 2002.* Pharma Ventures Ltd. 2002:20-46
23. Nallamothe R, Wood GC, Pattillo CB, et al. A Tumor Vasculature Targeted Liposome Delivery System for Combretastatin A4: Design, Characterization, and In Vitro Evaluation. *AAPS Pharm Sci Tech* 2006; 7(2):32.
24. Stryer L. Biosintesis lipid membran dan steroid. Dalam: *Biokomia.* Ed 4. EGC Kedokteran. 2000. hal.685-712
25. Thenawijata M. Biosintesis lipida. Dalam: *Lehninger: Dasar-Dasar Biokimia.* Erlangga. 2005. hal.277-309
26. Komatsu H. and Chong PLG. Low permeability of liposomal membranes composed of bipolar tetraether lipids from thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius.* *Biochemistry.* 1998;37:107-15.
27. New RRC (ed.). Introduction. In : *Liposomes. A Practical Approach.* IRL Press 1990 : 1-31.
28. Langworthy TA and Pond JL. Membranes and lipids of thermophiles. In: *Thermophiles; General, Molecular and Applied Microbiology.* TD Brock , ed. John Wiley and Sons. 1986: p.107-34.
29. De Rosa MA, Gambacorta and Gliozzi A. Structure, biosynthesis and physicochemical properties of archaebacterial lipids. *Microbiol Rev* 1986;50:70-80.
30. Kates M. Archaebacterial lipids: structure, biosynthesis and function. In: *The Archaebacteria: Biochemistry and Biotechnology.* M J Danson, D W. Hough and GG Lunt , eds. Portland Press. 1992. p. 51-72.
31. Kao YL., Chang EL, Chong PLG. Unusual pressure dependence of the lateral motions of pyrene-labeled phosphatidylcholine in bipolar lipid vesicles. *Bioche Biophys Res Commun.* 1988;188:1241-6.

32. Jarrel HC, Zukotynski KA and Sprott GD. Lateral diffusion of the total polar lipids from *Thermoplasma acidophilum* in multilamellar liposomes. *Biochem Biophys Acta*. 1998;1369:259-66.
33. Gregoriadis G. Liposomes as Drug Carriers: Recent Trends and Progress. John Wiley and Sons. 1988. p.102-33.
34. Mayhew E and Papahadjopoulos D. Therapeutic uses of liposomes. In: *Liposomes*. Ostro M, ed.1983. p.69-80.
35. Stern J. Freisleben HJ, Janku S, Ring K. Black lipid membranes of tetraether lipids from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim Biophys Acta* 1992;1128:227-36.
36. 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 of phospholipid fraction. *Appl Microbiol Biotech* 1994;40:745-52.
37. New RRC (ed). Characterization of liposomes. In: New RRC (ed.). *Liposomes. A Practical approach*. IRL Press 1991. p.105-61.
38. Zimmer, G. Membrane Structure in Disease and Drug Therapy. CRC Press. 2000. p.127-50.
39. Lo SL and Chang EL. Purification and characterization of a liposomal-forming tetraether lipid fraction. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;167:238-43.
40. De Rosa M and A Gambacorta. The lipids of archaebacteria. *Prog Lipid Res* 1988;27:153-75.
41. Komatsu H and Chong PLG. Low permeability of liposomal membranes composed of bipolar tetraether lipids from thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochemistry*. 1998;37:107-15.
42. New RRC (ed). Preparation of liposomes. In: New RRC (ed.). *Liposomes. A Practical approach*. IRL Press 1991: p.33-105.
43. Irawan AM. Cairan Tubuh, Elektrolit, dan Mineral. 2007. Diunduh dari: <http://www.pssplab.com>. [10 Agustus 2008]
44. (Anonim). Calcium Chloride. 2005. Diunduh dari: http://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_Chloride. [10 Agustus 2008]
45. Sastroasmoro S dan Sofyan I. Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis. Ed 3. Sagung Seto. 2008. hal.92-111.
46. Dahlan MS. Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan. Ed 1. PT Arksns Entertainment and Education in Harmony. 2004. hal.29-57..
47. Purwaningsih EH, Hamdani Z. Measuring The Diameter Liposom Using The Image Pro Express 4.5. 2007.
48. Freisleben HJ. The mainphospholipid of the Archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. Does the Liposome Technology with this unique Tetraether lipid provide novel perspectives for Biochemistry and Medicine? (Title translated from German to English). Habilitation at Johann-Wolfgang, Goethe-University, Frankfurt am Main, 1992.

LAMPIRAN

Data Lengkap Hasil Pengukuran Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Ukuran Kecil (Diameter ≤ 100 nm) Dalam Larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada Hari ke-0

CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 hari-0	Pengukuran Diameter Liposom (<i>pixel</i>)			Ukuran Standar Skala <i>Olympus</i>	Diameter Liposom (nm)
	1	2	Rata-Rata		
Foto 1	42,86	44,62	43,74	47 <i>pixel</i> /100nm	93,06
	29,45	30,78	30,12		64,07
	20,12	22,07	21,09		44,88
	42,99	32,71	37,85		80,53
	28,49	35,28	31,89		67,84
	47,38	42,24	44,81		95,34
	45,72	42,01	43,87		93,33
	20,00	20,02	20,01		42,57
	46,05	47,02	46,54		99,01
	21,74	22,99	22,37		47,59
	33,21	30,51	31,86		67,79
	17,08	24,89	20,99		44,65
	44,25	37,98	41,12		87,49
	36,34	36,34	36,34		77,32
	37,08	38,89	37,99		80,82
	Foto 2	40,95	45,71		43,33
28,70		24,90	26,80	57,02	
35,10		29,23	32,17	68,44	
23,82		22,36	23,09	49,13	
27,96		31,36	29,66	63,11	
39,72		37,93	38,83	82,61	
36,74		36,74	36,74	78,17	
35,63	32,49	34,06	72,47		

Data Lengkap Hasil Pengukuran Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Ukuran Kecil (Diameter ≤ 100 nm) Dalam Larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada Hari ke-0

CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 hari-0	Pengukuran Diameter Liposom (<i>pixel</i>)			Ukuran Standar Skala <i>Olympus</i>	Diameter Liposom (nm)		
	1	2	Rata-Rata				
Foto 3	42,86	42,32	42,59	47 <i>pixel</i> /100nm	90,62		
	25,13	21,82	23,48		49,95		
	19,80	22,25	21,03		44,73		
	36,29	32,83	34,56		73,53		
	40,49	42,48	41,49		88,27		
	25,22	23,9	24,56		52,26		
	27,00	27,52	27,26		58,00		
	42,81	44,15	43,48		92,51		
	36,58	42,29	39,44		83,90		
	33,38	27,45	30,42		64,71		
	31,16	25,22	28,19		59,98		
	38,08	36,35	37,22		79,18		
	40,24	39,92	40,08		85,28		
	Foto 4	29,26	27,23		28,25	47 <i>pixel</i> /100nm	60,09
		25,35	27,24		26,29		55,95
41,57		40,92	41,25	87,76			
44,09		40,59	42,34	90,09			
37,08		38,49	37,79	80,39			
34,73		36,68	35,71	75,97			
43,12		41,03	42,08	89,52			
30,68		24,21	27,45	58,39			
26,26		24,69	25,48	54,20			
32,42		32,53	32,48	69,09			
36,15		37,64	36,89	78,50			
31,67		26,19	28,93	61,55			
37,07	36,70	36,89	78,48				

Data Lengkap Hasil Pengukuran Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Ukuran Kecil (Diameter ≤ 100 nm) Dalam Larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada Hari ke-90

CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 hari-90	Pengukuran Diameter Liposom (<i>pixel</i>)			Ukuran Standar Skala <i>Olympus</i>	Diameter Liposom (nm)
	1	2	Rata-Rata		
Foto 1	27,31	26,02	26,66	47 <i>pixel</i> /100nm	56,73
	24,42	20,15	22,28		47,41
	37,17	38,50	37,83		80,50
	17,86	19,70	18,78		39,95
	25,95	24,04	24,99		53,18
Foto 2	46,41	46,56	46,48	47 <i>pixel</i> /100nm	98,90
	45,26	44,54	44,90		95,53
	45,85	44,81	45,33		96,44
	41,42	38,32	39,87		84,82
	38,32	36,76	37,54		79,87
	28,11	25,55	26,83		57,08
	39,98	31,01	35,49		75,52
	25,47	23,53	24,50		52,12
	36,22	33,36	34,79		74,02
	40,54	45,55	43,04		91,58
	29,01	27,15	28,08		59,74
	24,13	24,62	24,37		51,86
	38,85	38,00	38,42		81,75
Foto 3	34,09	30,90	32,49	47 <i>pixel</i> /100nm	69,13
	26,19	26,48	26,33		56,03
	24,34	28,83	26,58		56,56
	23,57	22,41	22,99		48,91
	43,42	39,07	41,24		87,75
	27,73	27,87	27,80		59,14
	27,55	27,78	27,66		58,86
	35,60	35,18	35,39		75,29
	21,24	21,55	21,39		45,52
Foto 4	26,67	23,08	24,87	47 <i>pixel</i> /100nm	52,92
	40,08	42,39	41,23		87,73
	23,37	19,02	21,19		45,09
	37,16	31,23	34,19		72,75
	41,81	31,61	36,71		78,10
	31,61	35,68	33,64		71,58
	38,25	37,46	37,85		80,54

Data Lengkap Hasil Pengukuran Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi Ukuran Besar (Diameter ≥ 100 nm) Dalam Larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada Hari ke-0

CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 hari-0	Pengukuran Diameter Liposom (<i>pixel</i>)			Ukuran Standar Skala <i>Olympus</i>	Diameter Liposom (nm)
	1	2	Rata-Rata		
Foto 1	56,95	51,77	54,36	47 <i>pixel</i> /100nm	115,66
Foto 2	49,63	52,65	51,14		108,81
	50,28	50,52	50,40		107,23
	45,80	48,80	47,30		100,64
	51,40	50,90	51,15	47 <i>pixel</i> /100nm	108,83
Foto 3	56,55	58,02	57,29		121,89
	55,93	53,31	54,62		116,21
	51,12	56,97	54,05		114,99
	51,27	51,86	51,57	47 <i>pixel</i> /100nm	109,71
Foto 4	51,59	52,30	51,95		110,52
	54,55	49,56	52,06		110,76
	51,47	52,60	52,04		110,72

Data Lengkap Hasil Pengukuran Liposom EPC-TEL 2,5 Kategori Besar (Diameter ≥ 100 nm) Hasil Sonikasi Dalam Larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 suhu 4°C pada Hari ke-90

CaCl ₂ 150 mOsmol pH 7 hari-90	Pengukuran Diameter Liposom (<i>pixel</i>)			Ukuran Standar Skala <i>Olympus</i>	Diameter Liposom (nm)
	1	2	Rata-Rata		
Foto 1	47,43	48,50	47,96	47 <i>pixel</i> /100nm	102,05
	54,08	48,58	51,33		109,21
	54,09	51,89	52,99		112,74
	60,05	62,38	61,21		130,24
Foto 2	53,07	47,36	50,21	47 <i>pixel</i> /100nm	106,84
	57,33	62,40	59,86		127,37
	64,45	61,60	63,02		134,09
Foto 3	63,80	58,04	60,92	47 <i>pixel</i> /100nm	129,61
Foto 4	51,3	50,91	51,10	47 <i>pixel</i> /100nm	108,73
	54,67	51,77	53,22		113,23
	50,91	56,57	53,74		114,34
	58,50	58,52	58,51		124,48
	60,87	58,53	59,70		127,02
	68,78	66,03	67,40		143,41

