

# **LAPORAN PENELITIAN**

## **UJI STABILITAS KIMIA LIPOSOM TETRA ETER LIPID YANG TERPAJAN NaCl pH7 350 mOsmol DENGAN LIPOSOM TETRA ETER LIPID YANG TERPAJAN CaCl<sub>2</sub> pH7 350 mOsmol**

Diajukan untuk memenuhi persyaratan  
Program Pendidikan Dokter Umum  
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia



**Disusun oleh :**

**Vania Myralda Giamour / 01105001707**

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

## **LEMBAR PERSETUJUAN**

**UJI STABILITAS KIMIA LIPOSOM TETRA ETER LIPID YANG  
TERPAJAN NaCl pH7 350 mOsmol DENGAN LIPOSOM TETRA ETER  
LIPID YANG TERPAJAN CaCl<sub>2</sub> pH7 350 mOsmol**

**VANIA MYRALDA GIAMOUR**

**0105001707**

**Pembimbing**

**Dra. Ida Hafiz, Apt., M.Si**

**NIP 130 932 210**

**Mengetahui,**

**Ketua Modul Riset 2007/2008**

**Dr. dr. Saptawati Bardosono, MSc**

**NIP 140 102 741**

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan YME atas berkat dan karuniaNya, penulis diberikan kemampuan dan kesabaran dalam menyelesaikan penelitian dan laporan penelitian.

Penulis menyadari banyaknya kekurangan dalam penulisan laporan penelitian ini, akan tetapi dengan banyaknya dukungan dan kerja sama dari berbagai pihak, penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan dengan baik.

Oleh karena itu, bersamaan dengan ini penulis ingin menghaturkan terima kasih kepada :

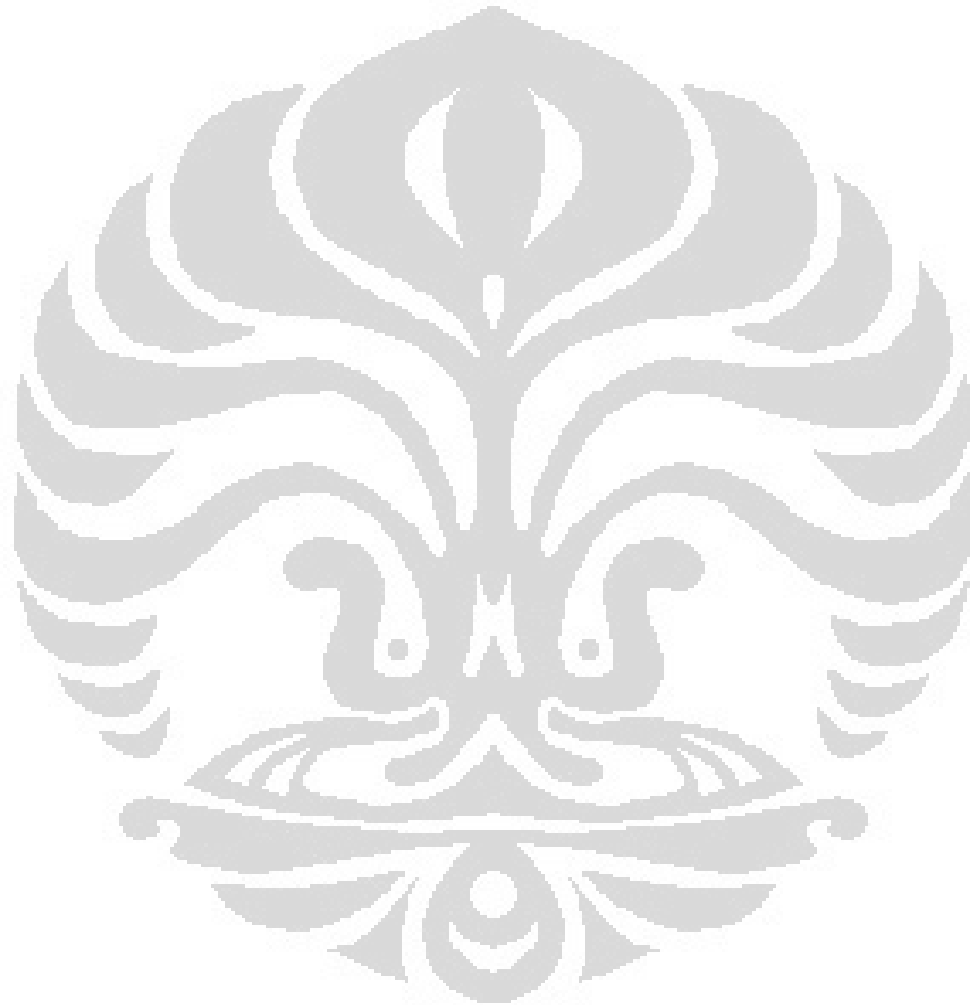
1. Keluarga dan teman-teman penulis yang selalu mendukung dengan doa sehingga penulis dapat tetap semangat.
2. Dra. Ida Hafiz selaku dosen pembimbing, yang selalu membantu dengan kritik yang membangun demi kebaikan laporan penelitian ini.
3. Dr. dr. Ernie H. Purwaningsih MS, yang telah menyediakan penelitian ini.
4. Dr. dr. Saptawati B., MSc, yang telah membantu saya dalam menganalisis penelitian ini dengan statistik.
5. Seluruh staf Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran FKUI yang telah sangat membantu penelitian ini dengan menyediakan waktu serta alat-alat untuk penyelesaian penelitian ini.

Penulis

## DAFTAR ISI

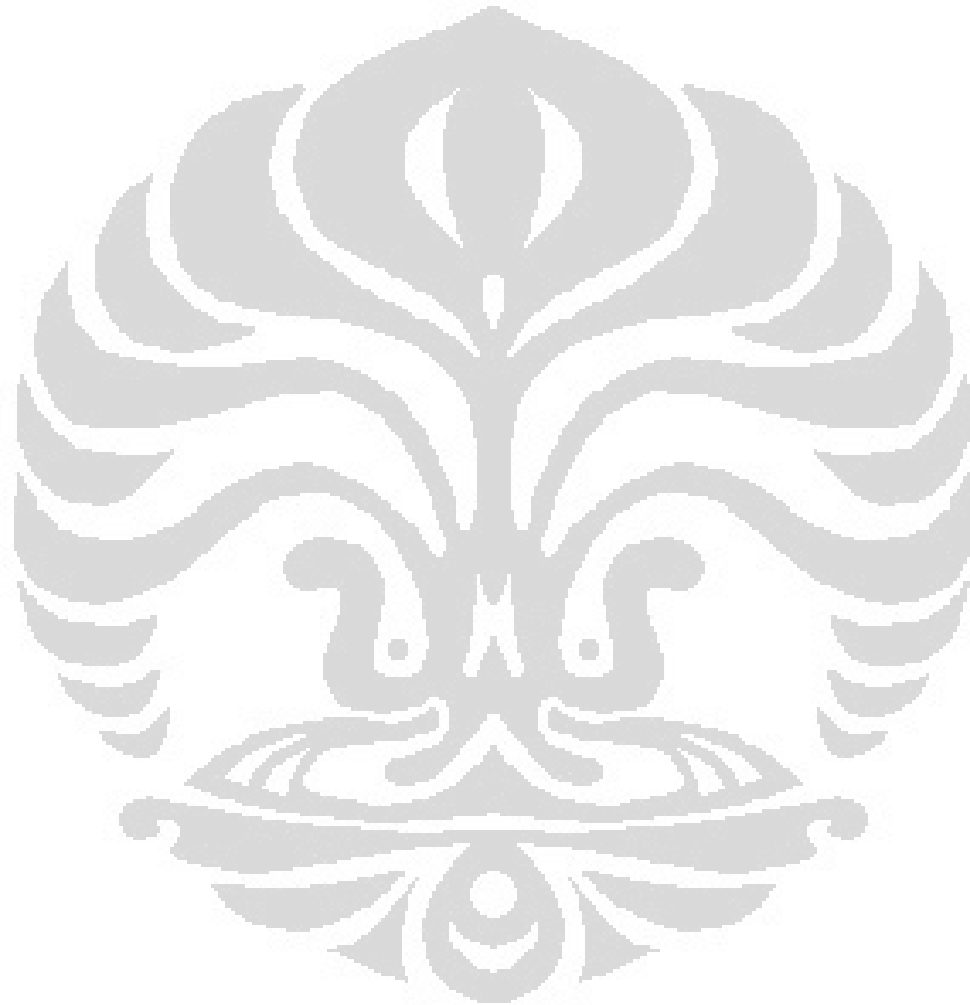
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>6</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>7</b>
<b>DAFTAR GRAFIK</b> .....	<b>8</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>10</b>
I.1 Latar Belakang Masalah.....	10
I.2 Rumusan Masalah.....	11
I.3 Tujuan Penelitian.....	11
I.3.1 Tujuan Umum.....	11
I.3.2 Tujuan Khusus.....	11
I.4 Manfaat Penelitian.....	12
I.5 Hipotesis.....	12
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>13</b>
II.1 Liposom.....	13
II.1.1 Struktur Liposom.....	13
II.1.2. Aplikasi Penggunaan Liposom.....	14
II.2 <i>Thermoplasma acidophilum</i> dan Tetraeter Lipid.....	16
II.2.1 <i>Thermoplasma acidophilum</i> .....	16
II.2.2 Tetraeter Lipid.....	16
II.3 Keseimbangan Cairan Tubuh.....	18
II.4 Alat dan Metoda untuk Mengubah Ukuran Liposom.....	20
II.4.1 Avestin Extruder.....	20
II.5 Alat dan Metoda untuk Menguji Kestabilan Liposom.....	21
II.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (Thin Layer Chromatography=TLC).....	21
II.6 Kerangka Konsep.....	23
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	<b>24</b>
III.1 Desain Penelitian.....	24
III.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	24
III.3 Besar Sampel.....	24
III.4 Alat dan Bahan.....	25

III.5 Rencana Analisis Data.....	30
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>32</b>
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>36</b>
V.1 Kesimpulan.....	36
V.2 Saran.....	36



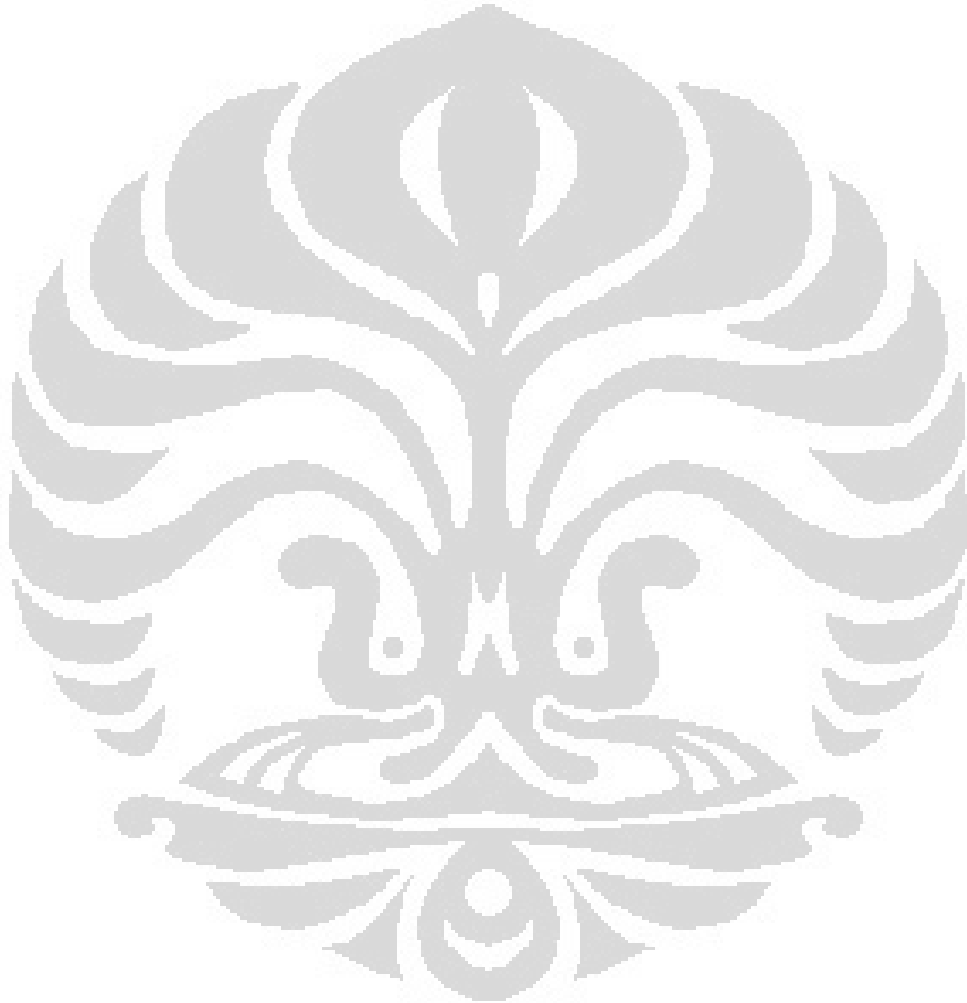
## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1.</b> Cairan Elektrolit Tubuh.....	19
<b>Gambar 2.</b> Liposom terpajan NaCl pH7 hari ke-8.....	33
<b>Gambar 3.</b> Liposom terpajan NaCl pH7 bulan ke-3.....	33



## DAFTAR TABEL

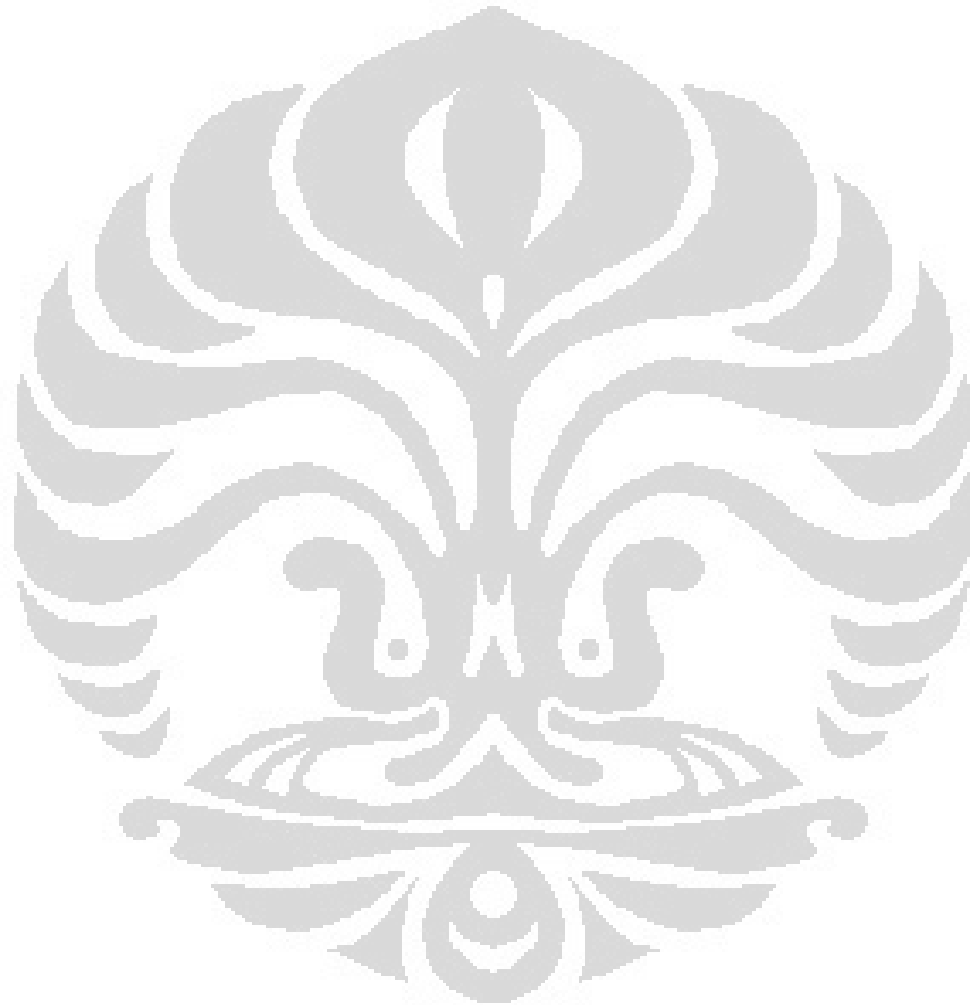
**Tabel 1.** Liposom EPC TEL 2,5 % setelah disonikasi dan terpajan dengan larutan kimia dari hari 1 - bulan 3.....32



## DAFTAR GRAFIK

**Grafik 1.** Perbandingan Liposom terpajan larutan NaCl pH 7 350 mOsmol dan CaCl<sub>2</sub> pH 7 350 mOsmol (diameter  $\leq$  100 nm ).....37

**Grafik 2.** Perbandingan Liposom terpajan larutan NaCl pH 7 350 mOsmol dan CaCl<sub>2</sub> pH 7 350 mOsmol (diameter  $>$  100 nm ).....37





## ABSTRAK

Liposom adalah suatu vesikel artifisial pembawa obat yang terbuat dari berbagai komponen lipid, misalnya kombinasi lesitin dan Tetra Eter Lipid (TEL). Kombinasi lesitin dan Tetra eter Lipid (TEL) merupakan komposisi yang stabilitasnya belum pernah diuji secara kimia baik in vitro maupun in vivo. Purwaningsih, dkk mengembangkan komposisi baru liposom, yaitu liposom EPC-TEL 2,5 yang mengandung lesitin/fosfatidilkolin kuning telur (*egg yolk phosphatidylcholine*) dan TEL (tetra eter lipid) 2,5 mol % dari *Thermoplasma acidophilum*. Penelitian ini bertujuan untuk menguji stabilitas liposom EPC-TEL 2,5 setelah disonikasi dan terpajan larutan NaCl pH7 dibandingkan dengan CaCl<sub>2</sub> pH7. Hasil dan Kesimpulan : tidak stabilnya liposom yang terpajan NaCl pH7 diameter  $\leq 100$  nm, stabilnya liposom yang terpajan CaCl<sub>2</sub> pH7 diameter  $\leq 100$  nm dan  $> 100$  nm.

*Kata kunci : liposom, EPC-TEL2,5, NaCl pH7, CaCl<sub>2</sub>pH7, stabilitas*

## ABSTRACT

Liposome is an artificial drug-carrier vesicle which composed of variety of lipid, e.g. combination of lecithin and Tetra Eter Lipid (TEL). The stability of combination of lecithin and TEL has not been tested chemically in vitro and in vivo. Purwaningsih et al developed the new composition of liposome, i.e. liposome EPC-TEL 2,5 composed of lecithin /egg yolk phosphatidylcholine and TEL 2,5 mol % from *Thermoplasma acidophilum*. This experiment was done to test the stability of liposome EPC-TEL 2,5 after sonicated and exposed by NaCl pH7 dan CaCl<sub>2</sub> pH7 from time to time. Result and conclusion: The liposomes with the diameter  $\leq 100$  nm exposed by NaCl pH7 is instable. The liposomes with the diameter  $\leq 100$  nm and  $> 100$  nm exposed by CaCl<sub>2</sub> pH7 is stable.

*Keywords : liposome, EPC-TEL2,5, NaCl pH7, CaCl<sub>2</sub>pH7, stability*

# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang Masalah

Sampai saat ini, telah dilakukan berbagai upaya untuk menurunkan efek samping obat dalam tingkat yang paling rendah. Salah satunya dengan menginkorporasikan obat tersebut ke dalam pembawa obat (*drug carrier*) sehingga obat dapat langsung mencapai organ sasaran. Pembawa obat haruslah mempunyai ciri-ciri tidak toksik, tidak mutagenik, maupun tidak imunogenik. Salah satu contoh pembawa obat adalah liposom.<sup>1,2</sup>

Liposom merupakan salah satu produk teknologi nano (*nanotechnology*) dengan ukuran antara 20 nm hingga 100  $\mu$ m dengan ketebalan dwilapis lipid sebesar 4 nm. Untuk aplikasi di bidang kedokteran, digunakan liposom berukuran 80-200 nm. Liposom yang berukuran 50-200 nm dapat dibuat dari berbagai komponen lipid misalnya lesitin dari kuning telur atau kedelai atau dari tetra eter lipid (TEL). TEL yang digunakan merupakan hasil destruksi membran Archaea, antara lain dari *Sulfolobus acidocaldarius* atau *Thermoplasma acidophilum*. Freisleben, dkk.<sup>3,4</sup> membuktikan bahwa TEL dari *Thermoplasma acidophilum* terbukti tidak toksik, tidak mutagenik atau antimutagenik pada uji toksisitas akut.

Purwaningsih, dkk mengembangkan komposisi liposom EPC-TEL<sub>2,5</sub><sup>5</sup> yang mengandung lesitin/fosfatidilkolin kuning telur (*egg yolk phosphatidyl choline*) dan TEL (tetra eter lipid) 2,5 mol % dari *Thermoplasma acidophilum*. Liposom ini dapat mengikat obat metilprednisolon palmitat lebih baik dan terbukti menunjukkan efek terapi, efek imunologik, serta terdistribusi dengan baik dalam organ yang berbeda bermakna dibandingkan kontrol yaitu metilprednisolon tanpa liposom.<sup>5-8</sup> Akan tetapi, keberhasilan tersebut belum didukung oleh data kestabilan liposom EPC-TEL<sub>2,5</sub> secara kimia *in vitro*.

Untuk membuktikan bahwa liposom EPC-TEL 2,5 tetap atau lebih stabil sebagai pembawa obat dibandingkan liposom lain secara kimia perlu dilakukan penelitian lebih tentang stabilitasnya.

Apabila kestabilan liposom EPC-TEL 2,5 telah diketahui, diharapkan dapat dimanfaatkan lebih luas sebagai pembawa obat-obat golongan lain untuk meningkatkan efektivitas obat dan menurunkan efek sampingnya sehingga aman digunakan dalam jangka panjang.

## **I.2 Rumusan Masalah**

- Apakah liposom EPC-TEL 2,5 terbukti stabil secara kimia setelah penambahan larutan garam NaCl pH 7 350 mOsmol dibandingkan dengan CaCl<sub>2</sub> pH 7 350 mOsmol?
- Apakah terdapat perbedaan kestabilan yang bermakna antara liposom EPC-TEL 2,5 yang ditambahkan larutan garam NaCl pH 7 350 mOsmol dibandingkan dengan CaCl<sub>2</sub> pH 7 mOsmol?

## **I.3 Tujuan Penelitian**

### **I.3.1 Tujuan Umum**

Penelitian ditujukan untuk menguji stabilitas liposom EPC-TEL 2,5 secara kimiawi

### **I.3.2 Tujuan Khusus**

1. Mengukur diameter partikel liposom yang telah disonikasi dan terpajan larutan NaCl 350 mOsmol pada pH7.
2. Mengukur diameter partikel liposom yang telah disonikasi dan terpajan larutan CaCl<sub>2</sub> 350 mOsmol pada pH7.
3. Menjumlahkan liposom yang berdiameter  $\leq 100$  nm pada ad 1 dan ad 2 di atas.
4. Menjumlahkan liposom yang berdiameter  $> 100$  nm pada ad 1 dan ad 2 di atas.

5. Menganalisis (dengan uji statistik) kestabilan liposom yang telah disonikasi dan terpajan larutan NaCl pH7 350 mOsmol.
6. Menganalisis (dengan uji statistik) kestabilan liposom yang telah disonikasi dan terpajan larutan CaCl<sub>2</sub> pH7 350 mOsmol.

#### **I.4 Manfaat Penelitian**

1. Pengejawantahan tridarma perguruan tinggi sebagai lembaga penyelenggara pendidikan, penelitian dan pengabdian bagi masyarakat.
2. Sebagai sumbangan dalam mengkaji pengaruh larutan NaCl pH 7 350 mOsmol dan CaCl<sub>2</sub> pH 7 350 mOsmol terhadap stabilitas liposom tetraeter lipid (EPC-TEL 2,5) hasil sonikasi.
3. Meningkatkan hubungan kerjasama dan saling pengertian antara pendidik dan mahasiswa.
4. Meningkatkan kualitas penelitian perguruan tinggi dalam rangka mensukseskan pencapaian visi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI) terkemuka 2010

#### **I.5 Hipotesis**

Liposom EPC-TEL<sub>2,5</sub> stabil apabila dipajankan oleh larutan NaCl pH 7 350 mOsmol dan CaCl<sub>2</sub> pH 7 350 mOsmol, disimpan dalam periode 3 bulan.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Liposom

##### II.1.1 Struktur Liposom

Liposom merupakan suatu vesikel membran yang dibentuk dengan cara mendispersikan suatu lipid, terutama fosfolipid, ke dalam media cair dan memiliki sifat-sifat yang memenuhi persyaratan sebagai pembawa obat atau vehikulum atau *drug-carrier*.<sup>3-4</sup>

Obat dapat dibawa ke target organ oleh liposom dengan berbagai cara yaitu, terikat dengan membran liposom, terinterkalasi di antara dwilapis lipid, terlarut dalam dwilapis lipid atau terlarut di dalam vesikel.<sup>3</sup>

Fosfolipid merupakan komponen struktural membran biologis yang terutama terdiri atas fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin dan fosfatidilinositol.<sup>9-13</sup> Fosfolipid yang lazim digunakan pada pembuatan liposom konvensional adalah lesitin (fosfatidilkolin) dari kuning telur (*Egg-yolk PhosphatidylCholine* = EPC), jaringan otak, kedelai (*soy-bean phosphatidylcholine* = SPC). Lipid yang dapat digunakan sebagai stabilisator membran liposom adalah tetra eter lipid (TEL) dari membran sel Archea, yaitu antara lain *Thermoplasma acidophilum* dan *Sulfolobus acidocaldarius*.<sup>14-16</sup>

Diameter atau ukuran liposom sangat ditentukan oleh beberapa hal, antara lain 1) jenis lipid dan kombinasinya, 2) keseimbangan antara energi untuk membuka membran liposom, elastisitas kelengkungan liposom dan jumlah energi yang tersebar, dan 3) cara pembuatan. Ukuran liposom dapat bervariasi antara 20 nm hingga 100 um dengan ketebalan dwilapis lipid sebesar 4 nm. Untuk aplikasi di bidang kedokteran, digunakan liposom berukuran 80-200 nm dan harus memperhatikan beberapa hal, yaitu konsentrasi lipid dan obat, distribusi ukuran liposom, persentase molekul obat

yang bebas atau yang tidak terinkorporasi pada membran liposom,  $\text{PH} < \text{osmolaritas}$ , konduktivitas, adanya kemungkinan produk hasil degradasi, endotoksin dan parameter-parameter lainnya.<sup>2</sup>

Persyaratan lain untuk penggunaan liposom sebagai pembawa obat adalah stabilitas baik fisik, kimia maupun biologi dan jumlah lapisan membran lipid per liposom.<sup>13,17</sup> Jumlah lapisan membran dan besar ukuran liposom ditentukan oleh cara pembuatannya.<sup>18-19</sup>

Kelarutan obat dalam air atau dalam lipid berpengaruh pada inkorporasi serta derajat retensi obat di dalam liposom. Obat yang bersifat hidrofil dengan koefisien partisi oktanol terhadap air ( $\log P_{\text{oct}} < 1,7$ ) akan tertahan di dalam fasa air bagian dalam (aqueous interior) atau di dalam vesikel dan akan dilepaskan secara lambat dalam beberapa jam atau hari. Obat dengan  $\log P_{\text{oct}} > 5$  atau bersifat hidrofob, akan tertanam di antara fasa hidrofob interior dari lapisan dwilapis lipid (lipid bilayer) yang diretensi dengan sempurna dalam liposom.<sup>19</sup>

### **II.1.2. Aplikasi Penggunaan Liposom**

Berbagai contoh keuntungan penggunaan liposom sebagai pembawa obat yang diperoleh dari berbagai hasil penelitian :

- 1) Percobaan pada tikus pasca transplantasi jantung membuktikan bahwa penggunaan metilprednisolon dengan liposom membutuhkan dosis lebih rendah daripada penggunaan metilprednisolon saja.<sup>20-23</sup>
- 2). Liposom juga berfungsi sebagai imunoajuvan (untuk memperkuat respon imun)<sup>24</sup> karena :
  - Mudah didegradasi.
  - Komposisi liposom dapat diubah-ubah sesuai kebutuhan.
  - Bila diperlukan, dapat dikombinasi dengan ajuvan lain untuk meningkatkan respon imun yang lebih kuat.

- Mudah dibuat dan lebih murah dibandingkan dengan zat pembawa obat lainnya.
  - Dapat mengubah zat non-imunogenik menjadi imunogenik sehingga antigen yang dibutuhkan hanya dalam jumlah kecil.
  - Dapat berinkorporasi dengan antigen hidrofobik dan antigen multipel.
  - Dapat menurunkan dan mengeliminasi toksisitas antigen yang bersifat toksik dan reaksi alergi terhadap protein non-toksik
  - Dapat mengatur sistem imun dan menginduksi imunitas
  - Memproduksi antibodi fungsional yang cukup tinggi sepanjang jangka waktu antibodi yang lazim.
- 4). Liposom juga sebagai zat pembawa yang ideal untuk zat yang berefek sebagai aktivator makrofag (imunomodulator) pada fase tumorisid, virosid ataupun mikrobisid yang dapat digunakan untuk terapi pada berbagai kanker dan infeksi parasit.<sup>25</sup>
- 5). Liposom juga dimanfaatkan sebagai bahan pembawa untuk terapi gen. Berbagai komposisi liposom dan modifikasinya telah diujikan agar gen yang dimaksud langsung mencapai sel sasaran.<sup>26</sup>

Sedangkan kerugian liposom sebagai pembawa obat adalah adanya kemungkinan menjadi antigen yang akan dirusak oleh sistem imun apabila komposisi liposom, terdapat sfingolipid, kardiopilin, kolestrol dalam jumlah tinggi, lebih dari 71 mol % atau lipid A (endoksitosis dari suatu bakteri Gram negatif).

## II.2 *Thermoplasma acidophilum* dan Tetraeter Lipid

### II.2.1 *Thermoplasma acidophilum*

*Thermoplasma acidophilum* (*Th.acidophilum*) merupakan *archaebacterium* asidofilik dengan pertumbuhan optimum pada suhu 59<sup>0</sup>C antara pH 1-2. Membran dari *Th.acidophilum* terdiri dari 3 fraksi utama: lipid apolar, glikolipid dan glikofosfolipid. Struktur dasar dari lipid membran adalah sebuah *diphytanylglyceroltetraether* yang berasal dari dua cincin C<sub>40</sub> isoprenoid. Membran lipid bipolar ini membentuk liposom yang stabil hingga diameter minimum (150 nm).

Liposom dengan fosfolipid utama dari *Thermoplasma acidophilum* (*Th.acidophilum*) ini tidak dihancurkan oleh asam. Resistensi liposom dari fosfolipid utama terhadap keasaman dan impermeabilitas terhadap proton dapat melindungi kandungan yang labil saat melewati pH asam selama di lambung, seperti protein dan peptida. Liposom sebagai kapsul dapat memungkinkan bahan-bahan yang labil dibawa melewati rute gastrointestinal. Pada penelitian yang dilakukan oleh Freisleben, dkk pada sel hidup membuktikan bahwa TEL dari *Thermoplasma acidophilum* tidak bersifat toksik dan antimutagenik.<sup>7</sup>

### II.2.2 Tetraeter Lipid

TEL adalah salah satu produk hasil ekstraksi dari Archaea terutama yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum*<sup>14-15</sup>, telah teruji tidak toksik dan tidak bersifat mutagenik atau antimutagenik, baik *in vitro* maupun *in vivo*<sup>3-4</sup>. TEL yang berasal dari *Sulfolobus acidocaldarius*, walaupun sudah digunakan dalam penelitian, namun belum teruji toksisitas seperti pada *Thermoplasma acidophilum*.

Lipid hasil ekstraksi membran dari Archae ini, misalnya *Thermoplasma acidophilum* dan *Sulfolobus acidocaldarius*, berbeda secara nyata bila dibandingkan dengan fosfolipid pada membran sel lain yang membentuk dwilapis lipid (lipid bilayer). Fosfolipid tersebut berupa eter-gliserol atau derivat poliol lain, seperti nonitol pada membran spesies *Sulfolobus*, membentuk satu lapisan lipid (lipid monolayer) yang tampak pada gambar.



Struktur membran tanpa ikatan rangkap ini mempunyai gugus metil samping yang sebagian membentuk pentasiklik, tanpa atau dengan residu fosfat yang terikat melalui ikatan ester. Ikatan eter-gliserol sangat resisten terhadap hidrolisis pada pH rendah sehingga memberi keuntungan lain dibandingkan dengan ikatan ester. Ketiadaan ikatan rangkap dalam struktur TEL akan meningkatkan resistensi terhadap oksidasi, sedangkan adanya gugus metil samping akan menambah efek fluiditas. Karena itu, liposom satu lapisan lipid (monolayer) yang dibentuk dari tetraeter lipid (TEL) dari Archaea tersebut, bersifat stabil dengan ikatan yang cukup erat.<sup>13-16</sup>

Membran *Thermoplasma acidophilum* terutama terdiri atas cincin dasar tetraeter. Pada suhu tinggi, 59°C, akan terbentuk pentasiklik secara simetris di antara rantai hidrokarbon yang lebih stabil dan menurunkan derajat rotasi bebas membran karena membran menjadi tebal.

Hingga saat ini belum ada satupun bukti tentang mekanisme interaksi TEL dengan membran sel hidup. Dugaan sementara dari hasil penelitian secara in vitro, interaksi TEL dengan membran sel adalah secara fusi membran, pertukaran lipid antarmembran dan endositosis. Demikian pula halnya dengan degradasi TEL di dalam sel yang hingga kini belum dapat dijelaskan dengan baik karena produk standar hasil degradasi TEL belum tersedia.<sup>13, 16, 27-28</sup>

Uji toksisitas TEL *Thermoplasma acidophilum* pada sel dengan menggunakan sel limfoma mencit L5178Y (EMAT cells) ataupun uji mutagenitas atau antimutagenitas pada *Salmonella typhimurium* TA100 membuktikan, bahwa TEL tidak toksik dan tidak mempunyai sifat mutagenik.<sup>3</sup> Uji toksisitas terhadap saraf pusat pada mencit NMRI dan uji ketahanan hidup dengan supresi imun juga membuktikan bahwa TEL tidak toksik dan dapat memperpanjang daya tahan hidup sedikit lebih lama dibandingkan kontrol.<sup>3-4</sup> Dosis letal 50 (LD50) TEL pada uji tersebut adalah lebih dari 324 mg/kgBB.<sup>28</sup>

Uji stabilitas liposom yang hanya terdiri atas TEL *Thermoplasma acidophilum* saja menunjukkan bahwa TEL ini cukup stabil pada pH rendah dibandingkan pada pH netral ataupun alkalis yaitu selama 109 minggu pada suhu 4-8°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°C. Uji stabilitas liposom TEL diukur berdasarkan ukuran partikel dengan menggunakan *particle sizer* dan uji pelepasan karboksifluoresens dari membran liposom.<sup>28</sup>

Ukuran partikel liposom TEL, terutama dari *Thermoplasma acidophilum*, sangat bervariasi bergantung pada cara pembuatannya. Dengan menggunakan *French Pressure Cell*, ukuran liposom hanya berkisar antara 120 nm, sedangkan yang dibuat dengan cara pengocokan menggunakan tangan (*hand-shaken*), ukuran liposom sangat besar hingga mencapai 7500 nm. Liposom hasil pengocokan dengan tangan dapat diperkecil dengan cara a) sonifikasi, menghasilkan liposom berukuran sekitar 600 nm, b) dialisis dengan detergen, membentuk liposom berukuran sebesar 370-450 nm dan c) ekstrusi melalui membran polikarbonat berpori 200 nm, sehingga ukuran liposom akan menjadi sekitar 220 nm.

Pada beberapa penelitian lain 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. Uji stabilitas berdasarkan ukuran partikel dengan nilai batas stabilitas sebesar 50% ini menunjukkan, bahwa pada suhu 4-8°C liposom tetap stabil hingga 622 hari walaupun ukuran partikel liposom membesar hingga 33% dari awal penyimpanan.<sup>28</sup>

### **II.3 Keseimbangan Cairan Tubuh**

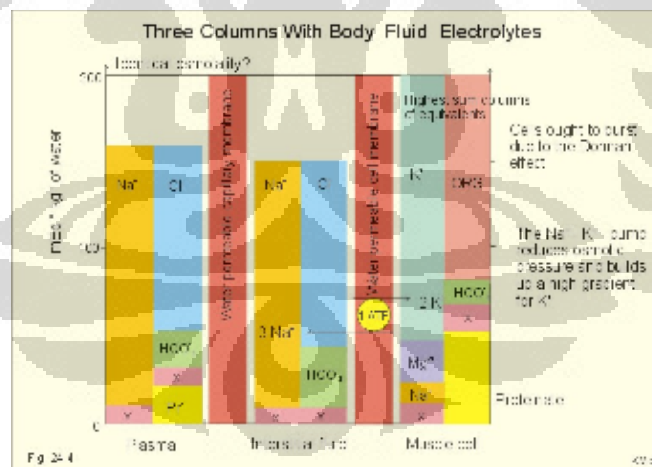
Secara rata-rata, cairan tubuh menyusun 60% dari berat total tubuh.<sup>29</sup> Angka ini bervariasi antara individu, bergantung pada seberapa banyak lemak (yaitu jaringan dengan kadar H<sub>2</sub>O yang lebih rendah) yang mereka miliki. Dua pertiga H<sub>2</sub>O tubuh terdapat di cairan intrasel (CIS) dan sepertiga sisanya terdapat di cairan ekstrasel (CES) yang terdistribusi antara plasma (20% dari CES) dan cairan interstisium (80% dari CES).

Karena semua konstituen plasma dapat dipertukarkan secara bebas menembus dinding kapiler, komposisi plasma dan cairan interstisium nyaris identik, kecuali

bahwa cairan interstisium tidak mengandung protein plasma. Sebaliknya komposisi CES dan CIS sangat berbeda karena sawar membran sel sangat selektif dalam menentukan bahan-bahan apa yang dapat dimasukkan ke atau dikeluarkan dari sel.

Salah satu komponen CES dan CIS adalah elektrolit. Walaupun terdapat dalam tubuh dengan kadar rendah, elektrolit mempunyai fungsi penting dalam keseimbangan cairan dan asam basa tubuh. Seperti terlihat pada Gambar 1, komponen elektrolit yang penting untuk homeostasis adalah  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{HCO}_3^-$ .

Terdapat 2 jenis natrium dalam tubuh, yaitu natrium yang mengalami pertukaran dan natrium yang tidak mengalami pertukaran (terfiksasi pada tulang).<sup>30</sup> Kadar normal natrium yang mengalami pertukaran dalam tubuh adalah 40 mmol/kg berat badan. Pada pasien dengan berat badan 75 kg, kadar natriumnya adalah 3000 mmol. Umumnya, jumlah total natrium tubuh 1000 mmol lebih besar daripada jumlah natrium yang mengalami pertukaran. hal ini disebabkan karena adanya natrium yang terfiksasi pada tulang.



Gambar 1. Cairan Elektrolit Tubuh<sup>39</sup>

Gambar di atas juga menunjukkan komposisi ionik per kilogram air. Dalam keadaan normal 1 liter plasma seberat 1,040 kg dan mengandung 10% material kering. Plasma terdiri dari air, protein plasma dan ion-ion. Fraksi air dalam plasma adalah sekitar 0,94.

## II.4 Alat dan Metoda untuk Mengubah Ukuran Liposom

Ukuran liposom dapat diubah dengan menggunakan beberapa cara, diantaranya adalah dengan menggunakan alat Avestin extruder.

### II.4.1 Avestin Extruder

Avestin Extruder merupakan alat penyaring yang dapat membuat vesikel unilamellar yang berukuran sampai 1 mikrometer dari vesikel multilamellar.<sup>31</sup> Alat penyaring ini terdiri dari dua *syringe* yang dapat didorong ke depan dan ke belakang, sehingga meminimalisir ukuran molekul, mengurangi penggantian filter selama berlangsungnya proses pembuatan unilamellar dan mempersingkat waktu. Diameter rata-rata vesikel unilamellar mendekati ukuran pori-pori filter yang mengekstrusi. Ekstrusi *per se* dapat mempertahankan kestabilan vesikel, yang terperangkap dalam *fluorescent dye* ketika mereka dihancurkan pada *freeze-thawing* dan selama ekstrusi pertama yaitu saat hampir semua vesikel multilamellar diubah menjadi vesikel unilamellar.

Vesikel unilamellar yang besar dihasilkan oleh teknik ekstrusi memiliki beberapa keuntungan: bebas dari pelarut organik dan deterjen, pengaturan konstituen lipid dalam keadaan seimbang dan mempertahankan kestabilan vesikel, ukuran dan strukturnya relatif homogen, membran sel menjadi unilamellar dan dapat diisi dengan volume yang cukup besar, dapat disiapkan dengan cepat dan mudah dari lipid kering dalam waktu kurang dari 1 jam. Alat penyaring ini dirancang untuk dapat digunakan secara manual, tidak di bawah pengaruh tekanan gas. Alat ini dapat mempertahankan kebersihannya karena sampel yang digunakan dapat didorong ke depan dan ke belakang melalui filter.

Fitur yang esensial dari mini-extruder ini adalah:

- Penunjang dari kedua sisi membran kebingga ketika dilakukan ekstrusi ke depan dan belakang, filter dapat dibersihkan
- Volum sampel untuk ekstrusi memungkinkan 0,25 ml untuk melewati filter.
- Kemampuan untuk mempertahankan tekanan sehingga membran filter tidak bocor atau ruptur.

## II.5 Alat dan Metoda untuk Menguji Kestabilan Liposom

Untuk menguji kestabilan liposom, dapat dipakai metode kromatografi.

### II.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (Thin Layer Chromatography=TLC)

TLC adalah salah satu dari model kromatografi yang menggunakan fase diam berupa gel silika dan fase eluen (gerak) yang dapat bergerak vertikal maupun horizontal.<sup>32</sup>

Kromatografi jenis ini penting untuk menganalisis steroid karena dapat memisahkan bahan-bahan yang berukuran 0,01 – 100 ug dalam waktu sangat singkat. Tetapi Rf pada TLC sulit ditetapkan dengan pasti karena sangat bergantung pada efek evaporasi fase gerak.<sup>33</sup>

Kecepatan elusi (peluruhan) bergantung pada kualitas dan aktivasi adsorben, kualitas dan saturasi solven sebagai fase gerak, teknik dan jarak elusi, tinggi lempeng yang terdalam dalam fase gerak, ketebalan lempeng, jumlah bahan yang akan diaplikasikan, serta temperatur.

Adsorben yang sering digunakan pada deteksi steroid adalah SiO<sub>2</sub> (gel silika), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (aluminium oksida), kalsium sulfat dan selulosa. Lempeng silika tidak memerlukan reaktivasi walaupun telah disimpan lama dalam kondisi tertutup rapat. Sedangkan lempeng aluminium harus dipanaskan selama ½ - 1 jam pada suhu 90 derajat Celcius. Terlebih saat akan digunakan untuk aktivitas tinggi, lempeng ini harus dipanaskan selama 4 jam pada suhu 200 derajat Celcius.

Pemilihan solven fase gerak bergantung pada polaritas steroid, yaitu bersifat eluotropik maupun miksotropik. Eluotropik adalah sifat di mana solven dapat teradsorpsi dengan baik pada adsorben yang hidrofil dan menyebabkan peningkatan peluruhan terhadap larutan teradsorpsi. Miksotropik adalah dua solven yang dapat saling bercampur dengan derajat polaritas yang sama tinggi.

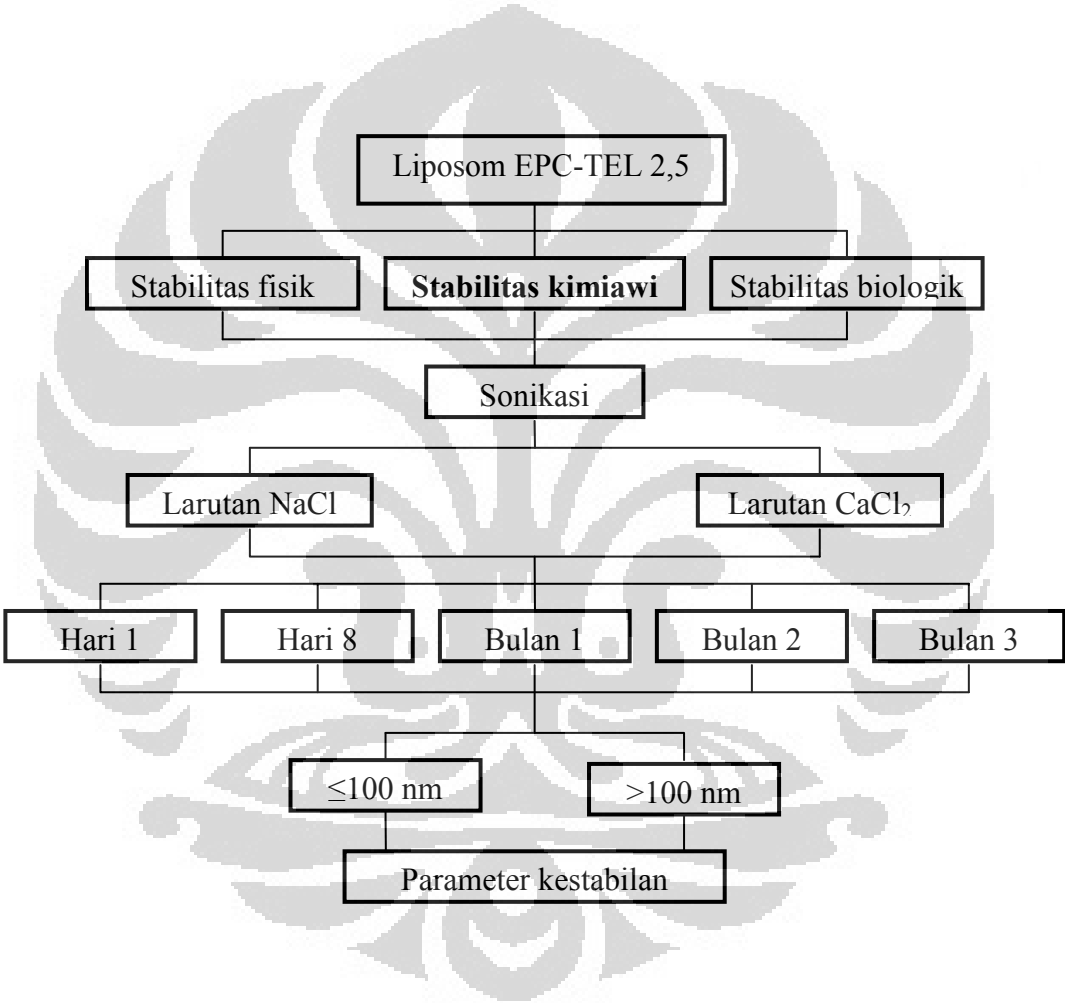
Deteksi dan metode evaluasi bercak pada lempeng silika dan aluminium oksida sangat menguntungkan karena dapat direaksikan dengan

pereaksi kuat dan dengan bantuan metode fluoresensi yang sensitif atau karbonisasi, molekul yang tidak reaktif pun akan terdeteksi dengan baik. Namun, lempeng ini tidak dapat digunakan untuk mendeteksi steroid dengan metode fotokopi UV dan fluoresensi alkali secara langsung.

Beberapa contoh penanda bercak yang lazim digunakan adalah  $H_2SO_4$  dalam air, asam fosfomolibdat dalam etanol, dan lain-lain. Evaluasi pada area bercak hanya cocok untuk perhitungan semi-kuantitatif.



II.6 Kerangka Konsep



# BAB III

## METODOLOGI PENELITIAN

### III.1 Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan studi eksperimental untuk mengetahui kestabilan kimia liposom EPC-TEL 2,5 secara *in vitro*.

### III.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Departemen Farmasi Kedokteran dan Laboratorium Fisika Departemen Fisika Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada bulan Februari 2007 sampai Juli 2007.

### III.3 Besar Sampel

Besar sampel penelitian ini dihitung dengan rumus Federer:

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

Keterangan:

n = jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t = jumlah kelompok perlakuan

$$(n-1)(10-1) \geq 15$$

$$(n-1)9 \geq 15$$

$$9n - 9 \geq 15$$

$$9n \geq 15 + 9$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 2,67$$



$n \geq 3$

Berarti, besar sampel tiap kelompok yang dibutuhkan untuk tiap peneliti adalah lebih atau sama dengan 3.

### III.4 Alat dan Bahan

#### A. Preparasi Liposom

##### Alat dan Bahan

1. 31 botol kecil
2. Round bottom glass 1 liter yang berisi 30 beads
3. Etanol 70%
4. Etanol 98% sebanyak 20 ml
5. Aquabidest
6. Aquadest
7. Micropipete
8. Liposom EPC sebanyak 78 mg
9. TEL 2,5% sebanyak 124  $\mu$ l
10. Quinacrine
11. Pendingin bersuhu 4<sup>0</sup>C
12. Ekstruder Avestin
13. Kertas Parafilm
14. Aluminium foil
15. Kloroform 98% sebanyak 20 ml
16. Rotavapor-Vacuum pump-Waterbath büchi
17. Es batu
18. Bath sonicator/ titanium probe sonicator Branson 1510
19. Filter PC 200 nm
20. Mikroskop
21. Kamera Panasonic WV-CP240

22. Software USB TV
23. Gelas objek kaca
24. Penutup gelas objek kaca

## **B. Cara Kerja**

1. Semua alat yang akan digunakan dicuci dengan etanol 70%, kemudian dengan Aquadest kemudian dicuci lagi dengan etanol 98%. Setelah itu dikeringkan.
2. Lakukan penimbangan liposom EPC dan TEL, campurkan kedua bahan tersebut
3. Lakukan pemanasan Rotavapor-Vacuum pump-Waterbath büchi
4. Masukkan air ke dalam Waterbath büchi sampai seperempat bagian dari Round bottom glass terendam
5. Panaskan air dengan suhu mencapai 40<sup>0</sup>C
6. Campurkan 20 ml etanol 98% dan 20 ml kloroform. Setelah itu ambil 1 ml campuran tersebut ke dalam EPC dan TEL untuk melarutkan. Kemudian tuang ke dalam Round bottom glass.
7. Lakukan berulang kali sampai tidak terlihat minyak. Kemudian tuang sisa campuran kloroform dan etanol ke dalam Round bottom glass.
8. Pasang Round bottom glass ke Rotavapor-Vacuum pump-Waterbath büchi
9. Nyalakan tombol pemutar
10. Nyalakan mesin vakum, atur perlahan hingga tekanan mencapai 200 milibar
11. Nyalakan mesin pendingin
12. Tunggu sampai larutan di dalam Round bottom glass terevaporasi dan timbul lapisan tipis.
13. kemudian turunkan tekanan secara perlahan sampai berada di bawah 50 milibar
14. Hentikan proses pembuatan bila sudah tidak tercium lagi aroma campuran kloroform dan etanol dalam Round bottom glass
15. Encerkan liposom yang sudah mengandung TEL dengan Aquabidest 50 ml
16. Ambil liposom dan kocok selama 15 menit

17. Lakukan perlakuan terhadap liposom dengan ketentuan sebagai berikut:

I. Setiap mahasiswa akan menggunakan sample yang sama yaitu:

1. Liposom
2. Liposom yang diekstrusi sebesar 200 nm
3. Liposom yang disonikasi selama 60 menit
4. Quinacrine yang digunakan sebagai kontrol negatif

II. Sedangkan sampel lainnya yang digunakan oleh masing-masing peneliti mempunyai kandungan yang berbeda dengan ketentuan sebagai berikut:

Peneliti 1

- 1) Liposom + larutan  $MgCl_2$  350 mOsmol pH 5
- 2) Liposom + larutan  $MgCl_2$  350 mOsmol pH 5 lalu diekstrusi sebesar 200 nm
- 3) Liposom + larutan  $MgCl_2$  350 mOsmol pH 5 lalu disonikasi selama 60 menit
- 4) Liposom + larutan  $MgCl_2$  350 mOsmol pH 7
- 5) Liposom + larutan  $MgCl_2$  350 mOsmol pH 7 lalu diekstrusi sebesar 200 nm
- 6) Liposom + larutan  $MgCl_2$  350 mOsmol pH 7 lalu disonikasi selama 60 menit

Peneliti 2

1. Liposom + larutan  $MgCl_2$  350 mOsmol pH 9
2. Liposom + larutan  $MgCl_2$  350 mOsmol pH 9 lalu diektrusi sebesar 200 nm
3. Liposom + larutan  $MgCl_2$  350 mOsmol pH 9 lalu disonikasi selama 60 menit

Peneliti 3

1. Liposom + larutan NaCl 350 mOsmol pH 7

2. Liposom + larutan NaCl 350 mOsmol pH 7 lalu diektrusi sebesar 200 nm
3. Liposom + larutan NaCl 350 mOsmol pH 7 lalu disonikasi selama 60 menit
4. Liposom + larutan CaCl<sub>2</sub> 350 mOsmol pH 7
5. Liposom + larutan CaCl<sub>2</sub> 350 mOsmol pH 7 lalu diektrusi sebesar 200 nm
6. Liposom + larutan CaCl<sub>2</sub> 350 mOsmol pH 7 lalu disonikasi selama 60 menit

#### Peneliti 4

1. Liposom + larutan NaCl 350 mOsmol pH 5
2. Liposom + larutan NaCl 350 mOsmol pH 5 lalu diektrusi sebesar 200 nm
3. Liposom + larutan NaCl 350 mOsmol pH 5 lalu disonikasi selama 60 menit
4. Liposom + larutan CaCl<sub>2</sub> 350 mOsmol pH 5
5. Liposom + larutan CaCl<sub>2</sub> 350 mOsmol pH 5 lalu diektrusi sebesar 200 nm
6. Liposom + larutan CaCl<sub>2</sub> 350 mOsmol pH 5 lalu disonikasi selama 60 menit

#### Peneliti 5

1. Liposom + larutan NaCl 350 mOsmol pH 9
  2. Liposom + larutan NaCl 350 mOsmol pH 9 lalu diektrusi sebesar 200 nm
  3. Liposom + larutan NaCl 350 mOsmol pH 9 lalu disonikasi selama 60 menit
  4. Liposom + larutan CaCl<sub>2</sub> 350 mOsmol pH 9
  5. Liposom + larutan CaCl<sub>2</sub> 350 mOsmol pH 9 lalu diektrusi sebesar 200 nm
  6. Liposom + larutan CaCl<sub>2</sub> 350 mOsmol pH 9 lalu disonikasi selama 60 menit
18. Buat larutan Quinacrine dan suntikkan ke dalam masing-masing larutan liposom dengan Quinacrine sebanyak 10 µl dengan micropipete.

19. Ambil 20  $\mu$ l dengan micropipete, tuang ke atas gelas objek kaca yang sudah mempunyai ukuran. Periksa di bawah mikroskop dengan perbesaran  $40 \times 10$ .
20. Hitung jumlah liposom per 10 lapang pandang. Hitung ukuran liposom dalam 10 lapang pandang. Rekam, foto, dan catat hasilnya.

### C. Perhitungan Liposom

#### 1. EPC

Diketahui : MR Liposom EPC = 780 gram

1 ml air = 10 mMolar liposom EPC

1 orang membutuhkan 10 ml larutan liposom

Dicari : Massa liposom tiap orang

$$M = \frac{n}{v}$$

$$M = \frac{\text{massa}/Mr}{v}$$

$$10 \text{ mM} = \frac{\text{massa}/78}{10 \text{ mL}}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa} &= 10 \text{ mL} \times 10 \text{ mM} \times 78 = 10 \times 10^{-3} \times 10 \times 10^{-3} \times 78 \\ &= 78 \times 10^{-3} \text{ gram} = 78 \text{ miligram} \end{aligned}$$

$$\text{Untuk 5 orang} = 78 \text{ miligram} \times 5 = 390 \text{ miligram}$$

#### 2. TEL

Diketahui : TEL  $\rightarrow$  2,5 % dari mol EPC

$$Mr \text{ TEL} = 1488,4$$

Dicari : massa TEL

$$\text{Mol TEL dalam 10 mL air} = \frac{2,5}{100} \times 100 \text{ mMolar} = 2,5 \text{ mmol TEL}$$

$$\text{Massa TEL} = Mr \times \text{mol} = 1488,4 \times 2,5 = 3,721 \text{ untuk tiap orang}$$

$$\text{Untuk 5 orang} = 3,721 \times 5 = 18,625$$

EPC + TEL dilarutkan menjadi 50 ml liposom. TEL yang tersedia = 150 mg/ml.

Dalam 1 ml larutan terdapat 150 mg TEL.

$$\text{Volume TEL yang dibutuhkan} = \frac{18,625}{150} \times 1 \text{ mL} = 0,124 \text{ mL}$$

Dengan spuit (1mL = 80 IU), maka 0,124 mL = 9,92 IU  $\approx$  10 IU

### 3. Quinacrine

$$\text{Diketahui : } \frac{2,5 \text{ miligram Quinacrine}}{50 \text{ miligram lipid}} = 5\%$$

$$\text{Berarti } \frac{5 \text{ gram}}{100 \text{ cc larutan}} \approx 5\% \text{ Quinacrine dalam larutan}$$

Dicari : massa Quinacrine

$$\begin{aligned} \text{Lipid} &= \text{EPC} + \text{TEL} = 390 + 18,625 \\ &= 408,625 \text{ miligram lipid dalam 50mL liposom} \end{aligned}$$

$$\text{Massa Quinacrine} = \frac{5}{100} \times 408,625 = 20,431 \text{ miligram} = 0,02 \text{ gram}$$

Quinacrine yang dilarutkan dalam buffer 5 cc

$$5\% \rightarrow \text{kalo 10 cc} \rightarrow 0,5 \text{ gram} = 500 \text{ mg}$$

Hasil pengenceran 5 x  $\rightarrow$  dalam 50 cc dibutuhkan 0,5 gram

$$\text{Dalam 5 cc buffer} \rightarrow 0,5 \times \frac{5}{50} = 50 \text{ miligram}$$

Volume Quinacrine :

$$\frac{20,431 \text{ mg}}{50 \text{ mL}} \times 1000 \mu\text{L} = 408 \mu\text{L larutan Quinacrine untuk 50 mL liposom}$$

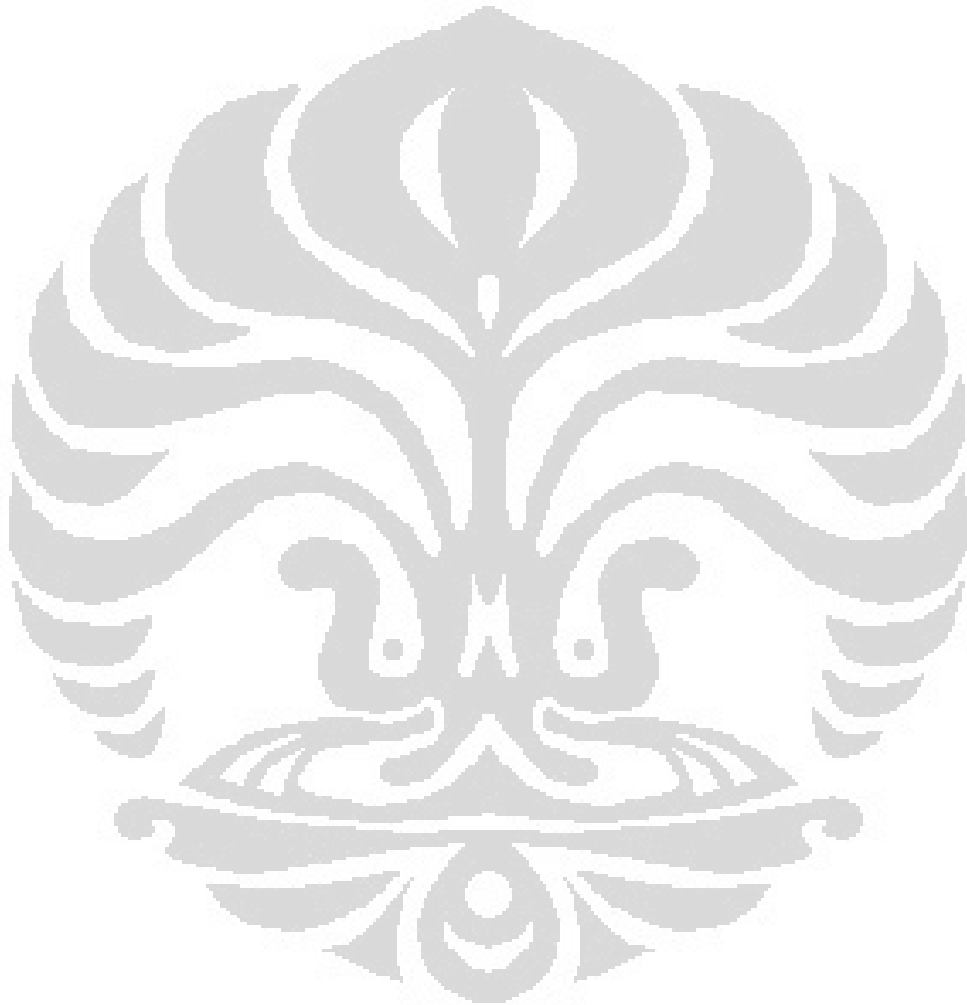
$$\text{Tiap 40 preparat : } \frac{408 \mu\text{L}}{40} = 10,2 \mu\text{L}$$

$$\text{Diencerkan 10 x (ditambah 40 cc)} = 102 \mu\text{L}$$

### III.5 Rencana Analisis Data

Untuk menguji kestabilan liposom yang terpajan dengan larutan NaCl pH 7 350 mOsmol dan CaCl<sub>2</sub> pH 7 350 mOsmol, peneliti menggunakan uji statistik dengan metoda one-way Anova. Apabila didapatkan sebaran data tidak normal, maka dilakukan transformasi dengan Kolmogorov-Smirnov. Kemudian jika sebaran data

masih tidak normal, maka digunakan uji statistic dengan metoda Kruskal-Wallis. Setelah itu, untuk melihat pada periode mana liposom dinyatakan tidak stabil, peneliti menggunakan *post-hoc*.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan liposom terpajan NaCl pH7 350 mOsmol pada kelima waktu dibandingkan dengan hasil pengamatan liposom terpajan CaCl<sub>2</sub> pH7 350 mOsmol pada kelima waktu. Liposom EPC-TEL 2,5 dikatakan stabil bila jumlah liposom yang berdiameter  $\leq 100$  nm dan  $> 100$  nm tidak berubah dari awal penelitian. Hasil uji stabilitas liposom EPC-TEL 2,5 % setelah disonikasi dan terpajan dengan larutan kimia tertera pada tabel 1. Pada tabel 1 dapat dilihat bahwa terjadi perubahan jumlah liposom yang berdiameter  $\leq 100$  nm dan  $> 100$  nm nm dari waktu ke waktu .

*Tabel 1. Liposom EPC TEL 2,5 % setelah disonikasi dan terpajan dengan larutan kimia dari hari 1 - bulan 3.*

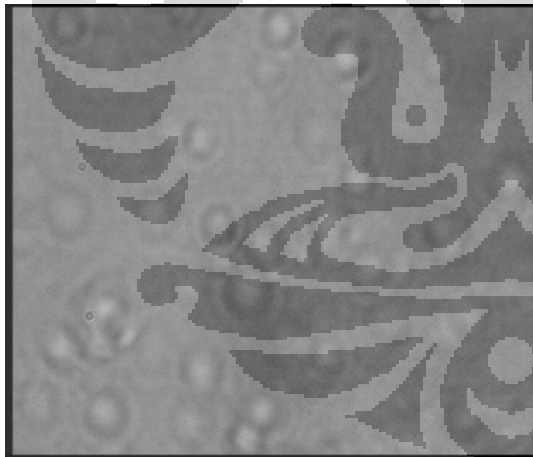
	NaCl pH 7		CaCl <sub>2</sub> pH 7	
	$\leq 100$	$>100$	$\leq 100$	$>100$
<b>Hari 1</b>	238	0	93	0
	200	0	57	2
	70	0	50	2
<b>Hari 8</b>	227	0	218	0
	180	1	102	0
	148	0	105	0
<b>Bulan 1</b>	143	0	101	0
	141	0	62	15
	147	0	101	5
<b>Bulan 2</b>	85	0	69	19
	41	66	73	24
	57	1	183	15
<b>Bulan 3</b>	61	0	141	0
	43	6	76	49
	16	0	106	10



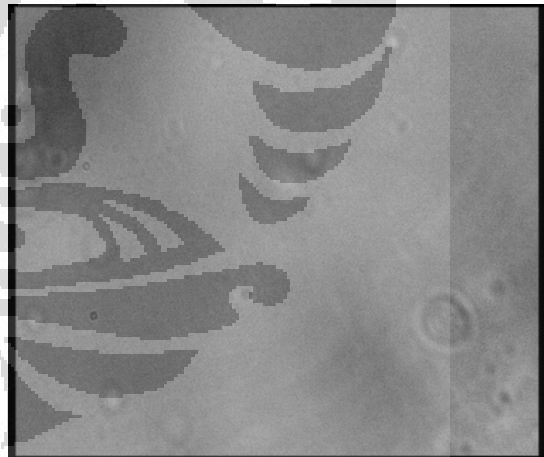
Berdasarkan analisa statistik dengan metode kruskal-wallis didapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna jumlah liposom berdiameter  $\leq 100$  nm antar kelompok yang terpajan NaCl pH7 dan yang terpajan CaCl<sub>2</sub> pH7 dan yang disimpan pada periode tertentu. Serta tidak terdapat perbedaan bermakna jumlah liposom berdiameter  $> 100$  nm antar kelompok yang terpajan NaCl pH7 dan yang terpajan CaCl<sub>2</sub> pH7 dan yang disimpan pada periode tertentu.

Hasil metode kruskal-wallis pada kelompok liposom yang berdiameter  $\leq 100$  nm kemudian di tes kembali dengan post hoc test untuk mengetahui pada kelompok mana perbedaan bermakna itu ada.

Dari uji post hoc didapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada kelompok liposom terpajan NaCl pH7 yang disimpan sampai hari ke 8 dan bulan ke 3. Hal ini menunjukkan bahwa adanya ketidakstabilan pada kelompok tersebut.



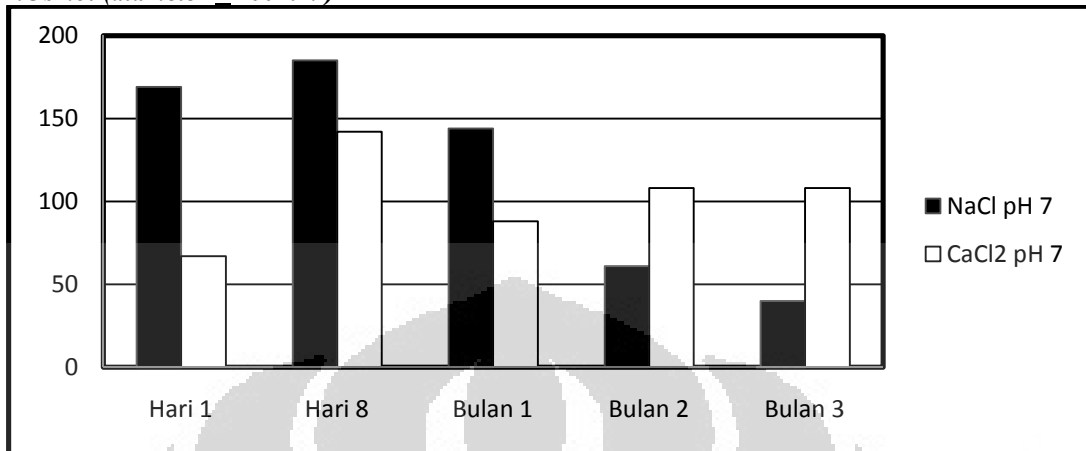
*Gambar 3. Liposom terpajan NaCl pH7 hari ke-8*



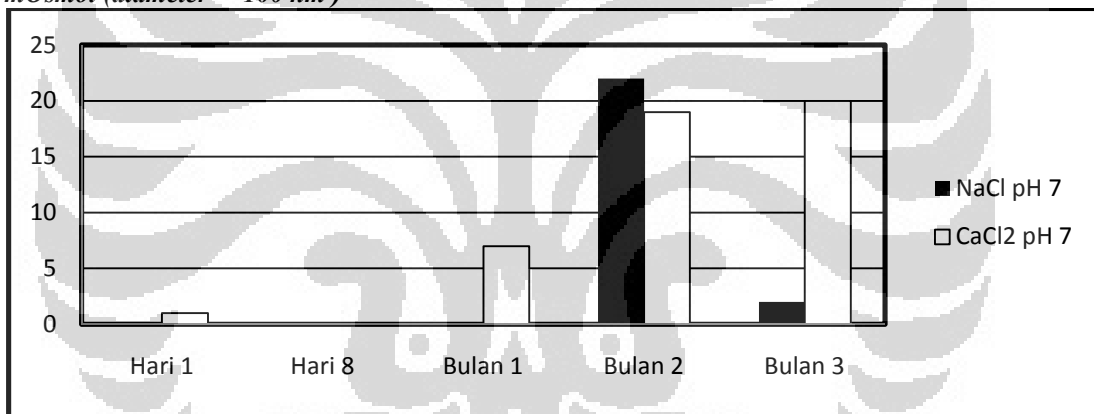
*Gambar 4. Liposom terpajan NaCl pH7 bulan ke-3*

Sedangkan kelompok liposom berdiameter  $\leq 100$  nm yang terpajan CaCl<sub>2</sub> pH7, tidak menunjukkan perbedaan bermakna, yang berarti liposom dalam keadaan stabil.

**Grafik 1. Perbandingan Liposom terpajan larutan NaCl pH 7 350 mOsmol dan CaCl<sub>2</sub> pH 7 350 mOsmol (diameter < 100 nm)**



**Grafik 2. Perbandingan Liposom terpajan larutan NaCl pH 7 350 mOsmol dan CaCl<sub>2</sub> pH 7 350 mOsmol (diameter > 100 nm)**



Hasil pengamatan kelompok liposom dengan diameter > 100 nm yang terpajan NaCl pH7 adalah 0, sehingga tidak dapat dilakukan uji stabilitas liposom, walaupun pada pengamatan bulan-bulan tertentu (misalnya bulan ke-2 dan bulan ke-3) dapat ditemukan liposom yang dapat diabaikan karena dapat disebabkan oleh fusi liposom. Sedangkan pada pengamatan kelompok liposom dengan diameter > 100 nm yang terpajan CaCl<sub>2</sub> pH7, menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna, yang berarti liposom dalam keadaan stabil.

Perubahan yang terjadi pada liposom berdiameter baik  $\leq 100$  nm dan  $> 100$  nm dalam kelompok liposom terpajan NaCl pH7 disebabkan oleh berbagai macam faktor, yaitu

- perhitungan dan pengukuran diameter secara kasar oleh peneliti
- penggumpalan liposom yang mengakibatkan pengurangan jumlah
- pemecahan liposom yang mengakibatkan penambahan jumlah
- larutan NaCl yang tidak fisiologis untuk liposom berdiameter  $\leq 100$  nm

Uji kestabilan liposom EPC-TEL 2,5 % harus diperkuat dengan uji stabilitas menggunakan larutan kimia lain serta uji fisika dan biologi.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### V.1 Kesimpulan

Liposom EPC-TEL 2,5 tersonikasi berdiameter  $\leq 100$  nm yang terpajan NaCl pH7 menunjukkan adanya perbedaan bermakna dalam kuantitas dan diameter liposom pada penghitungan statistik analitik, yang berarti liposom dalam keadaan tidak stabil. Liposom EPC-TEL 2,5 tersonikasi berdiameter  $\leq 100$  nm yang terpajan CaCl<sub>2</sub> pH7 tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna, yang berarti liposom dalam keadaan stabil.

Liposom EPC-TEL 2,5 tersonikasi berdiameter  $> 100$  nm yang terpajan NaCl pH7 tidak dapat diuji stabilitasnya karena hasil pengamatan adalah 0.

Liposom EPC-TEL 2,5 tersonikasi berdiameter  $> 100$  nm yang terpajan CaCl<sub>2</sub> pH7 menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna dalam kuantitas dan diameter liposom pada penghitungan statistik analitik, yang berarti liposom dalam keadaan stabil.

#### V.2 Saran

Dari kesimpulan yang didapat, diharapkan penelitian terhadap liposom akan semakin dikembangkan untuk menstabilkan liposom dengan tambahan pajanan larutan fisiologis CaCl<sub>2</sub> pH7 yang dibantu dengan uji fisika dan biologi.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Lasic DD (ed). Liposomes as drug delivery system Liposomes from Physics ti Application. Elsevier Science publisher BV.1993.p.265-324.
2. Lasic DD. Liposomes. *Science and Medicine* 1996 (may-June): 34-43
3. Freisleben HJ, Neisser C, Hartmann M, Rudolph P, Geck P, Ring K, Muller WEG. Influence of the main phospholipids (MPL) from *Thermoplasma acidophilum* and of liposomes from MPL on living cells: cytotoxicity and mutagenicity. *J Liposome Research* 1993;3(3):817-33.
4. Freisleben HJ, Bormann J, Litzinger DC, Lehr F, Rudolph P, Schatton W, Huang L. Toxicity and biodistribution of liposomes of the main phospholipids from the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum* in mice. *J Liposome Research* 1995;5(1):215-23
5. Ernie HP, Freisleben HJ, Sadikin M. Peningkatan Inkorporasi metilprednisolon palmitat pada liposome yang mengandung tetraeter lipid dari membran *Sulfolobus acidocaldarius* membentuk sediaan baru liposomal metilprednisolon palmitat. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2002; 1(1): 24-30.
6. Effendi AR. Efek Liposom metilprednisolon palmitat terhadap kadar TNF $\alpha$  dan distribusinya di hepar dan limpa mencit. Tesis Program Studi Ilmu Biomedik FKUI, Program pascasarjana UI, November 2002.
7. Wawaimuli Arozal, FD Suyatna. Ernie H Purwaningsih, Hedi R Dewoto. Peningkatan Efek Antiinflamasi Sediaan Metilprednisolon dalam bentuk Liposom. *MKI* 2005; 56(1): 17-22.
8. Nina Marliana 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.
9. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson D (eds). The plasma membrane. The lipid bilayer in: *Molecular Biology of the cell*. Garland publish. Inc. 1983:255-317.
10. Zubay GL(ed). Lipids and membranes. In : *Biochemistry*. 4<sup>th</sup> ed.Wm. C. Brown Publisher.1998:443-61.
11. Karp G(ed). The structure and function of the plasma membrane. In : *Cell and molecular Biology; Concept and Experiment*.2<sup>nd</sup> ed. John Wiley& Sons Inc.1999: 128-130.
12. New RRC (ed). Introduction. In *Liposomes. A practical Approach*. IRL Press 1990 :1-31
13. Lasic DD(ed). Chemistry of Lipids and Liposomes. In: *Liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993: 1-42.
14. Stern J. Freisleben HJ, Janku S, Ring K. Black lipid membrane of tetraether lipids from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim Biophys Acta* 1992;1128:227-36.
15. 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 phospholipids fraction. *Appl Microbiol Biotech* 1994;40:745-52.
16. Sugai A, Sakuma R, Fukuda I, Kurosawa N, Itoh YH, Kon K, Ando S, Itoh T. The structure of the core polyol of the ether lipids from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Lipids* 1995;30 (4) : 339-44.
  17. New RRC. Characterization of liposomes. In : New RRC (ed). *Liposomes. A Practical approach*. IRL Press 1991 : 105-61.
  18. New RRC. Preparation of liposomes. In: New RRC(ed). *Liposomes. A Practical approach*. IRL Press 1991; 33-104.
  19. Lasic DD(ed). Preparation of liposomes.in: *Liposomes from physics to Application*. Elsevier Publisher BV 1993:63-107.
  20. Mishina EV, Jusko WJ. Selected tissue distribution of liposomal methylprednisolone in rats. *Res Commun chem. Pathol Pharmacol* 1994b;84:47-52.
  21. 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.
  22. Binder J, Mishina EV, Jusko WJ, Kupiec- Weglinski JW. Prolongation of cardiac allograft survival in rats by liposome- encapsulated methyl- prednisolone. *Transplantation* 1994; 58 (5) : 633-5.
  23. Mishina EV, Jusko WJ. Liposomal methyl-prednisolon in rats: dose-proportionality and chronic -dose pharmacokinetics/pharmacodynamic. *Pharm Res* 1996: 13 (1) : 141-5 (abstract).
  24. Lasic DD. Liposomes as immunoadjuvants. In: *Liposomes from physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993 : 347-64.
  25. Daemen T, Regts J, Morselt H, Scherphof GL. The effect of liver macrophages on colon carcinoma cells: evidence of macrophage activation. *Int J Immunopharmac* 1992;14(5):857-64.
  26. Dickson D. UK scientist test liposome gene therapy technique. *Nature* 1993, 365:4.
  27. Patel GB, Agnew BJ, Deschatelets L, Fleming LP, Sprott GD. In vitro assessment of archaosome stability for developing oral delivery systems. *Int J Pharmac* 2000;194:39-49.
  28. Freisleben HJ. The main phospholipids of the Archaeobacterium *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
  29. Lauralee Sherwood. Fluid and Acid-Base Balance. In: *Human Physiology from Cells to Systems*, 5<sup>th</sup> ed. Thomson Learning, Inc 2004: 559-87.
  30. Paulev PE. Textbook in Medical Physiology and Pathophysiology: Essentials and Clinical Problems. Body fluids and their regulation. [serial online] 2000. [Cited 2008 February 29]. Diunduh dari [www.mfi.ku.dk/ppaulev/chapter24/kap%2024.htm](http://www.mfi.ku.dk/ppaulev/chapter24/kap%2024.htm)

31. Robert C. MacDonald, Ruby I. MacDonald, Bert Ph.M. Menco, Keizo Takeshita, Nanda K. Subbarao, Lan-rong Hu. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. 1990; 297-303.
32. Neher R (ed). Thin Layer Chromatography in: *Steroid Chromatography*. 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier Publ. Comp. 964:234-79.
33. Van Renswoude AJBM, Blumenthal R, Weinstein JN. Thin-Layer chromatography with agarose gels. A quick, simple method for evaluating liposome size. *Biochim Biophys Acta* 1980;595:151-6.

