



UNIVERSITAS INDONESIA

**KESTABILAN FORMULASI TERBARU LIPOSOM
EPC-TEL2,5 HASIL SONIKASI DAN EKSTRUSI
TERHADAP SUHU PENYIMPANAN 4°C DALAM 84 HARI**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran**

**DWI NOTOSUSANTO
0105000581**

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

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Dwi Notosusanto

NPM : 0105000581

Tanda Tangan :

Tanggal : 25 Juni 2009

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Dwi Notosusanto
NPM : 010500581
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Judul Skripsi : Kestabilan Formulasi Terbaru Liposom EPC-TEL2,5 Hasil Sonikasi dan Ekstrusi Terhadap Suhu Penyimpanan 4°C Dalam 84 Hari

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada Program Studi Pendidikan Dokter Umum Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : DR. dr. Ernie H. Purwaningsih, MS ()
Penguji : DR. dr. Ernie H. Purwaningsih, MS ()
Penguji : DR. Dr. Saptawati Bardosono, MSc. ()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 25 Juni 2009

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami sampaikan kepada Allah SWT yang telah memberikan kesabaran dan kekuatan untuk merencanakan, melaksanakan dan menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Kedokteran pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Terima kasih kami sampaikan kepada:

1. Dr. dr. Ratna Sitompul, SpM (K) selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI);
2. Dr. dr. Saptawati Bardosono, MSc. selaku ketua modul riset FKUI 2008-2009;
3. Dr. dr. Ernie H. Purwaningsih, MS selaku ketua Modul Riset FKUI 2007-2008, dosen pembimbing, dan penanggungjawab penelitian ini, yang telah menyediakan penelitian sehingga kami dapat berpayung pada penelitian beliau;
4. Seluruh staf Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran FKUI, Departemen Fisika Kedokteran FKUI dan Departemen Farmakologi Kedokteran FKUI yang telah mendukung penelitian ini dengan memberi petunjuk penggunaan alat, mempersiapkan alat dan ruangan serta bersedia menunggu hingga sore hari ketika kami melakukan penelitian;
5. Keluarga penulis yang tercinta, yang selalu memberikan dukungan berupa moral, material dan spiritual sehingga mempermudah penulis dalam menyelesaikan skripsi ini; dan
6. Seluruh teman-teman yang terlibat dalam pengumpulan data penelitian untuk skripsi ini.

Kami menyadari bahwa sedikit banyak terdapat kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Karena itulah kami mengharapkan saran maupun kritik yang membangun untuk perbaikan penulisan laporan ini dan bagi penulis kedepannya.

Jakarta, 25 Juni 2009

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA
ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dwi Notosusanto
NPM : 0105000581
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif (*Non-Exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul: "Kestabilan Formulasi Terbaru Liposom EPC-TEL2,5 Hasil Sonikasi dan Ekstrusi Terhadap Suhu Penyimpanan 4°C Dalam 84 Hari" beserta perangkat yang ada (bila diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 25 Juni 2009

Yang menyatakan,

Dwi Notosusanto

ABSTRAK

Nama : Dwi Notosusanto
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Judul : Kestabilan Formulasi Terbaru Liposom EPC-TEL2,5 Hasil Sonikasi dan Ekstrusi Terhadap Suhu Penyimpanan 4°C Dalam 84 Hari

Latar belakang: Inkorporasi obat ke dalam bahan pembawa obat yaitu liposom dapat menurunkan dosis terapi dan dapat langsung mencapai organ sasaran. Hal ini merupakan upaya penekanan efek samping obat. Tapi, liposom EC-TEL2,5 sebagai formula baru belum pernah diuji stabilitas secara fisik. **Tujuan:** Menguji stabilitas fisik liposom EPC-TEL2,5 hasil sonikasi dan ekstrusi dibandingkan dengan kontrol pada suhu penyimpanan 4°C. **Metode:** Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental *in vitro* pada tiga kelompok liposom, yaitu kelompok ekstrusi 200 nm, kelompok sonikasi dan kelompok kontrol. Pengamatan terhadap sediaan liposom dilakukan pada hari ke-0, hari ke-7, hari ke-28, hari ke-56 dan hari ke-84. Hasil pengamatan dikategorikan menjadi dua, yaitu liposom dengan diameter ≤ 100 nm dan diameter > 100 nm. **Hasil:** Hasil uji statistik *Kruskall-Wallis* dan analisis *post hoc Mann-Whitney* didapatkan nilai probabilitas 0,935 ($p=0,935$) untuk liposom hasil sonikasi dengan kategori diameter ≤ 100 nm, sedangkan nilai probabilitas untuk liposom hasil sonikasi dengan kategori diameter > 100 nm adalah 0,242 ($p=0,242$). Nilai probabilitas untuk liposom hasil ekstrusi dengan diameter ≤ 100 nm adalah 0,007 ($p=0,007$), sedangkan nilai probabilitas untuk liposom hasil ekstrusi dengan kategori diameter > 100 nm adalah 0,008 ($p=0,008$). **Kesimpulan:** Liposom EPC-TEL2,5 hasil sonikasi yang disimpan ada suhu 4°C selama 84 hari bersifat stabil secara fisik, sedangkan hasil ekstrusi yang disimpan ada suhu 4°C selama 84 hari bersifat tidak stabil secara fisik dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Kata kunci :

Liposom, EPC-TEL2,5, ekstrusi, sonikasi, stabilitas

ABSTRACT

Name : Dwi Notosusanto
Study Program : General Medicine
Title : The Stability of New Formula Liposome EPC-TEL2,5 as Result of Sonication and Extrusion After Being Incubated at 4°C Within 84 Days

Background: Incorporation of drug in drug vehicle, liposome, can lower drug concentration within therapeutic dose and can arrive at target organ directly. This is one way to suppress side effect of drugs. But, liposome EPC-TEL2,5 as new formula has not been tested for physical stability. **Objective:** To test the physical stability of liposome EPC-TEL2,5 prepared by extrusion, sonication compared to control at incubation temperature 4°C. **Methods:** This research is experimental study (in vitro) in three groups of liposomes, they are 200 nm-extrusion group, sonication group and control group. Observation to all groups of liposomes were done in 0 day, 7th day, 28th day, 56th day and 84th day. The result of this observation is the amount of liposomes categorized in two groups, they are liposomes with diameter > 100 nm and liposomes with diameter ≤ 100 nm. **Result:** Post hoc analysis with Mann-Whitney test showed that the probability value is 0,935 (p=0,935) for liposomes as result of sonication with diameter ≤ 100 nm, and the probability value for liposomes as result of sonication with diameter > 100 nm is 0,242 (p=0,242). The probability value of liposomes as result of extrusion with diameter ≤ 100 nm is 0,007 (p=0,007), and the probability value for liposomes as result of extrusion with diameter > 100 nm is 0,008 (p=0,008). **Conclusion:** Liposomes EPC-TEL 2,5 as result of sonication which have been incubated at 4°C for 84 days were physically stable and extrusion incubated at 4°C for 84 days were physically unstable compared to control group.

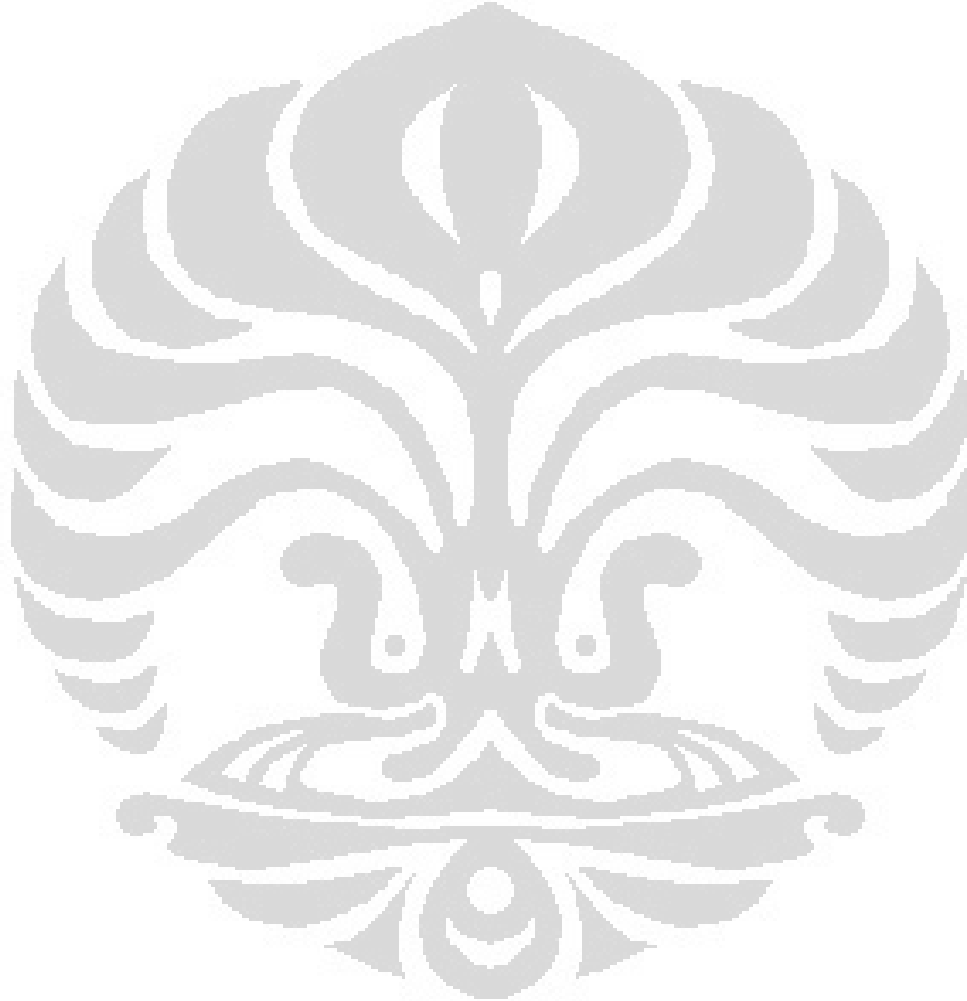
Keywords :

Liposome, EPC-TEL2,5, extrusion, sonication, stability

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	v
ABSTRAK	vi
<i>ABSTRACT</i>	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Pertanyaan Penelitian	3
1.4. Hipotesis	3
1.5. Tujuan Penelitian	3
1.5.1. Tujuan Umum	3
1.5.2. Tujuan Khusus	3
1.6. Manfaat Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Liposom	5
2.1.1. Sejarah Liposom	5
2.1.2. Definisi dan Komponen Penyusun Liposom	5
2.1.3. Inkorporasi Obat pada Liposom dan Pembuatan Liposom	7
2.1.4. Muatan Permukaan Liposom	9
2.2. <i>Tetra Ether Lipid</i> (TEL)	10
2.3. Temperatur	13
2.4. Kerangka Konsep	15
3. METODE PENELITIAN	16
3.1. Desain Penelitian	16
3.2. Waktu dan Tempat	16
3.3. Besar Sampel	16
3.4. Alat dan Bahan	17
3.4.1. Alat	17
3.4.2. Bahan	18
3.5. Cara Kerja	18
3.5.1. Perhitungan Liposom	18
3.5.2. Pembuatan Preparasi Liposom	20
3.5.3. Pengamatan Liposom	24
3.6. Identifikasi Variabel	25

3.7. Manajemen dan Analisis Data	25
3.8. Definisi Operasional	25
3.9. Alur Penelitian	26
4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	27
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
5.1. Kesimpulan.....	34
5.2. Saran	34
DAFTAR REFERENSI	35

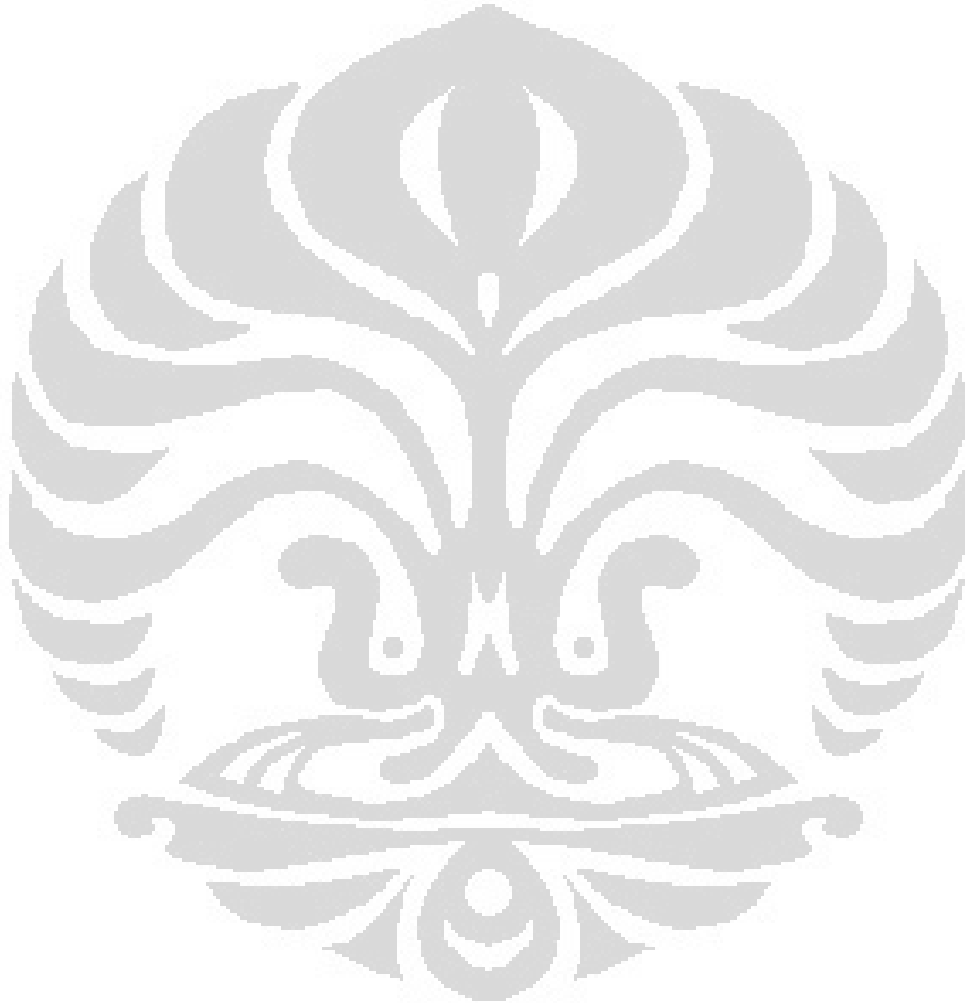


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur molekuler fosfolipid	6
Gambar 2.2. Struktur liposom dengan berbagai kemungkinan cara obat terinkorporasi	7
Gambar 2.3. Gambaran interaksi antara obat dengan liposom secara skematik.....	8
Gambar 2.4. Skema bagian kepala dan ekor lemak pada liposom	9
Gambar 2.5. Membran liposom dari TEL yang terdiri atas satu lapis lipid	10
Gambar 2.6. TEL <i>Thermoplasma acidophilum</i>	11
Gambar 2.7. Gambaran skematis inkorporasi TEL dalam membran dwilapis lipid dari EPC.....	12
Gambar 3.1. Büchi Rotavapor	21
Gambar 3.2. Liposom yang telah mengering	22
Gambar 3.3. Liposom yang sedang disonikasi	23
Gambar 3.4. Liposom yang sedang diekstrusi	23
Gambar 3.5. Foto skala ÷Olympusö pembesaran 400x	24
Gambar 4.1. Foto liposom pada hari ke-0, hari ke-7, hari ke-28, hari ke 56, dan hari ke 84 (perbesaran 400 x)	27

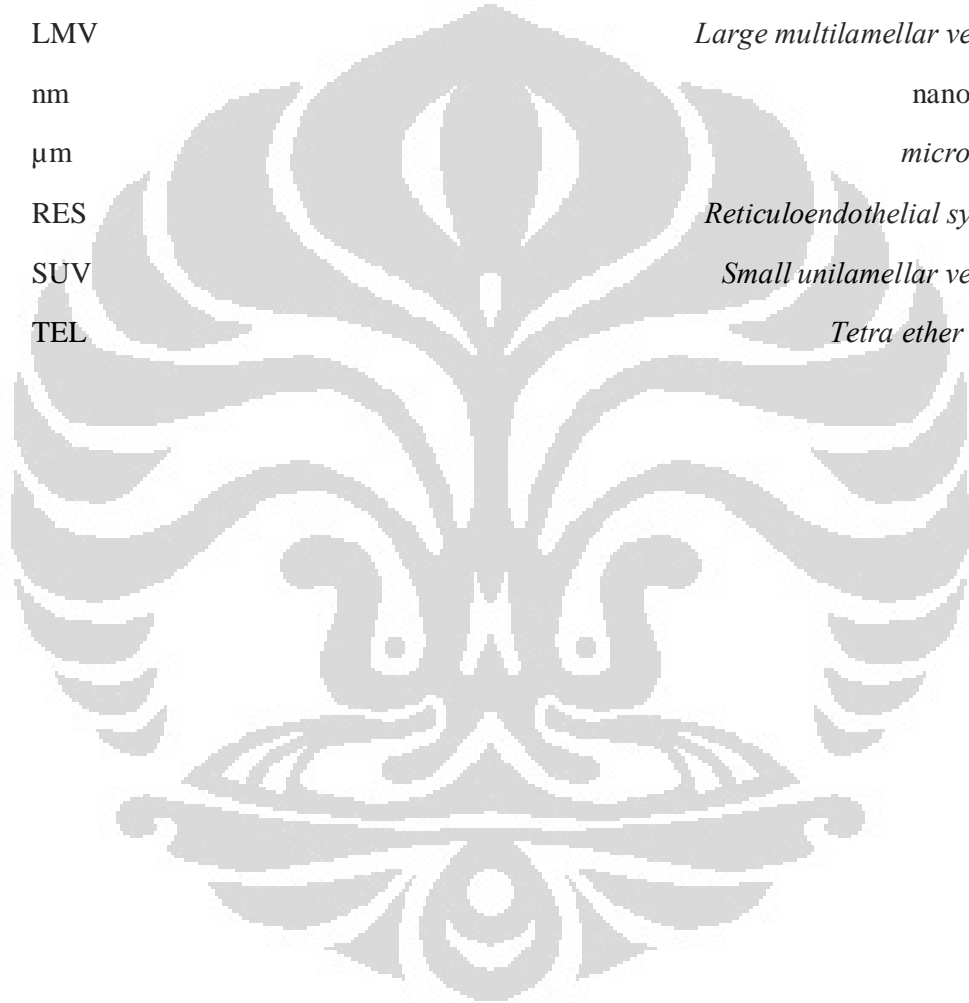
DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Hasil pengamatan jumlah dan diameter liposom EPC-TEL2,5 kontrol, hasil ekstrusi dan hasil sonikasi pada inkubasi suhu 4°C.....30



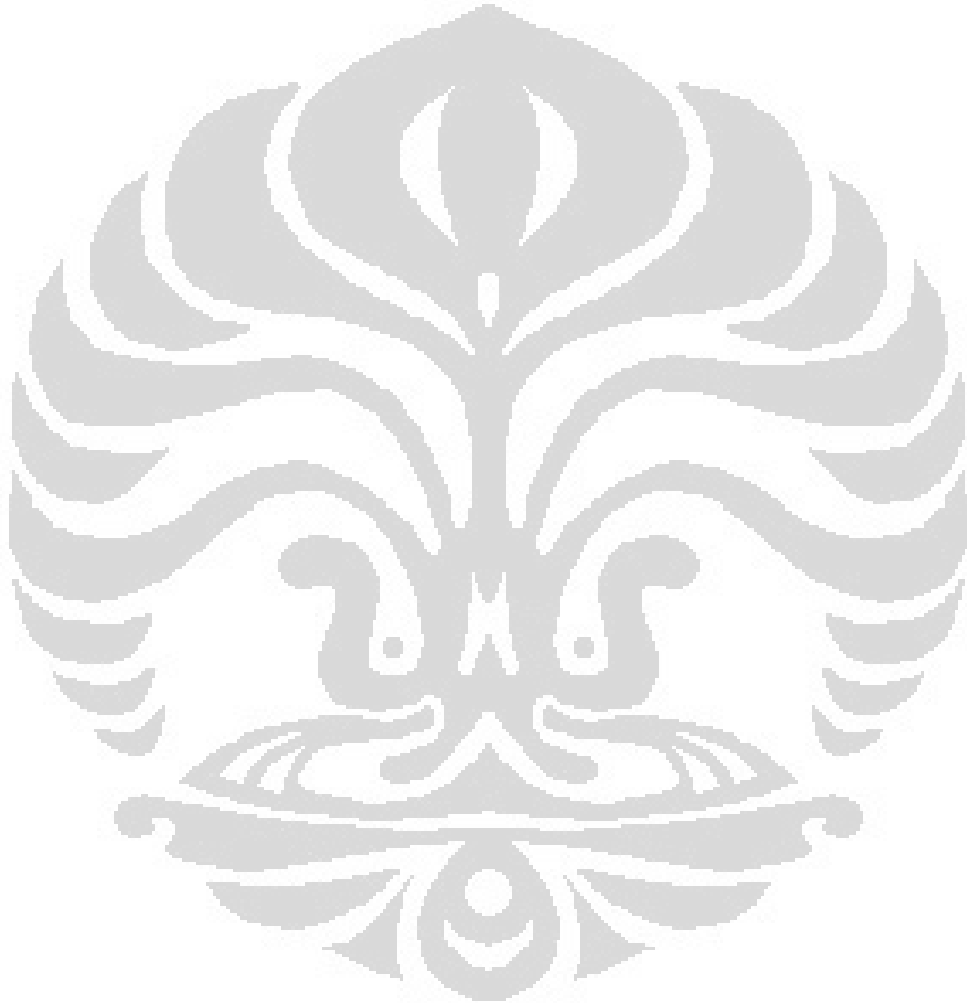
DAFTAR SINGKATAN

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPPC	<i>Dipalmitoylphosphatidylcholine</i>
DPPG	<i>Dipalmitoylphosphatidylglycerol</i>
EPC	<i>Egg-yolk Phosphatidyl Choline</i>
LMV	<i>Large multilamellar vesicles</i>
nm	<i>nanometer</i>
μm	<i>micrometer</i>
RES	<i>Reticuloendothelial systems</i>
SUV	<i>Small unilamellar vesicles</i>
TEL	<i>Tetra ether lipid</i>



DAFTAR LAMPIRAN

<i>Curriculum Vitae</i>	40
-------------------------------	----



ABSTRAK

Nama : Dwi Notosusanto
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Judul : Kestabilan Formulasi Terbaru Liposom EPC-TEL2,5 Hasil Sonikasi dan Ekstrusi Terhadap Suhu Penyimpanan 4°C Dalam 84 Hari

Latar belakang: Inkorporasi obat ke dalam bahan pembawa obat yaitu liposom dapat menurunkan dosis terapi dan dapat langsung mencapai organ sasaran. Hal ini merupakan upaya penekanan efek samping obat. Tapi, liposom EC-TEL2,5 sebagai formula baru belum pernah diuji stabilitas secara fisik. **Tujuan:** Menguji stabilitas fisik liposom EPC-TEL2,5 hasil sonikasi dan ekstrusi dibandingkan dengan kontrol pada suhu penyimpanan 4°C. **Metode:** Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental *in vitro* pada tiga kelompok liposom, yaitu kelompok ekstrusi 200 nm, kelompok sonikasi dan kelompok kontrol. Pengamatan terhadap sediaan liposom dilakukan pada hari ke-0, hari ke-7, hari ke-28, hari ke-56 dan hari ke-84. Hasil pengamatan dikategorikan menjadi dua, yaitu liposom dengan diameter ≤ 100 nm dan diameter > 100 nm. **Hasil:** Hasil uji statistik *Kruskall-Wallis* dan analisis *post hoc Mann-Whitney* didapatkan nilai probabilitas 0,935 ($p=0,935$) untuk liposom hasil sonikasi dengan kategori diameter ≤ 100 nm, sedangkan nilai probabilitas untuk liposom hasil sonikasi dengan kategori diameter > 100 nm adalah 0,242 ($p=0,242$). Nilai probabilitas untuk liposom hasil ekstrusi dengan diameter ≤ 100 nm adalah 0,007 ($p=0,007$), sedangkan nilai probabilitas untuk liposom hasil ekstrusi dengan kategori diameter > 100 nm adalah 0,008 ($p=0,008$). **Kesimpulan:** Liposom EPC-TEL2,5 hasil sonikasi yang disimpan ada suhu 4°C selama 84 hari bersifat stabil secara fisik, sedangkan hasil ekstrusi yang disimpan ada suhu 4°C selama 84 hari bersifat tidak stabil secara fisik dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Kata kunci :

Liposom, EPC-TEL2,5, ekstrusi, sonikasi, stabilitas

ABSTRACT

Name : Dwi Notosusanto
Study Program : General Medicine
Title : The Stability of New Formula Liposome EPC-TEL2,5 as Result of Sonication and Extrusion After Being Incubated at 4°C Within 84 Days

Background: Incorporation of drug in drug vehicle, liposome, can lower drug concentration within therapeutic dose and can arrive at target organ directly. This is one way to suppress side effect of drugs. But, liposome EPC-TEL2,5 as new formula has not been tested for physical stability. **Objective:** To test the physical stability of liposome EPC-TEL2,5 prepared by extrusion, sonication compared to control at incubation temperature 4°C. **Methods:** This research is experimental study (in vitro) in three groups of liposomes, they are 200 nm-extrusion group, sonication group and control group. Observation to all groups of liposomes were done in 0 day, 7th day, 28th day, 56th day and 84th day. The result of this observation is the amount of liposomes categorized in two groups, they are liposomes with diameter > 100 nm and liposomes with diameter ≤ 100 nm. **Result:** Post hoc analysis with Mann-Whitney test showed that the probability value is 0,935 (p=0,935) for liposomes as result of sonication with diameter ≤ 100 nm, and the probability value for liposomes as result of sonication with diameter > 100 nm is 0,242 (p=0,242). The probability value of liposomes as result of extrusion with diameter ≤ 100 nm is 0,007 (p=0,007), and the probability value for liposomes as result of extrusion with diameter > 100 nm is 0,008 (p=0,008). **Conclusion:** Liposomes EPC-TEL 2,5 as result of sonication which have been incubated at 4°C for 84 days were physically stable and extrusion incubated at 4°C for 84 days were physically unstable compared to control group.

Keywords :

Liposome, EPC-TEL2,5, extrusion, sonication, stability

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada beberapa penyakit yang menyangkut sistem imunologik, misalnya lupus eritematosus sistemik, artritis reumatik, kanker atau pasca transplantasi organ, diperlukan terapi obat dengan dosis tinggi untuk jangka panjang. Obat yang digunakan pada pemberian sistemik umumnya sangat toksik, misalnya siklosporin, pada pasca transplantasi organ, yang bersifat nefrotoksik dan neurotoksik¹⁻³. Obat lain, misalnya kortikosteroid dapat bersifat *immunocompromise*, sehingga mempermudah terjadinya infeksi sekunder terutama infeksi jamur dan efek samping berat lainnya³.

Hingga saat ini, berbagai upaya telah dilakukan agar efek samping obat dapat ditekan serendah mungkin dengan cara, antara lain, menginkorporasikan obat tersebut ke dalam pembawa obat (*drug carrier*), sehingga obat dapat langsung mencapai organ sasaran. Salah satu pembawa obat yang telah banyak diteliti dan terbukti dapat menurunkan efek samping obat baik pada uji eksperimental maupun pada uji klinik adalah liposom⁴⁻⁷.

Liposom merupakan suatu vesikel sferis yang membrannya dibentuk dari dua lapis yang menyerupai membran sel⁸⁻⁹. Umumnya liposom terdiri atas fosfatidil kolin dan dapat juga mengandung fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, sfingomielin, kolesterol dan lipid lain dengan atau tanpa bahan lain sebagai stabilisator⁹⁻¹⁰. Jenis obat yang telah berhasil diinkorporasikan dengan liposom terbukti meningkatkan efek terapi serta menurunkan efek samping obat. Dengan mengubah struktur permukaan atau dengan mengikatkan suatu ligan tertentu, liposom dapat efektif sebagai pembawa obat ke organ sasaran lain yang mempunyai reseptor spesifik¹¹⁻¹².

Sebagai salah satu produk teknologi nano, liposom berukuran 20 nm - 100 μ m akan digunakan dalam bidang kedokteran dan farmasi¹³. Diameter atau ukuran liposom sangat ditentukan oleh beberapa hal, antara lain: 1) jenis lipid dan kombinasinya, sebagai contoh: liposom yang terbuat dari campuran EPC dan

kolesterol, berdiameter lebih besar (100-200 nm) dibandingkan liposom dari EPC saja (<100 nm); 2) cara pembuatan, liposom yang dibuat dengan cara *hand-shaken* akan berbentuk multilamellar dan berukuran besar (LMV= *Large Multilamellar Vesicle*) sedangkan liposom yang dibuat dengan cara mengekstrusinya melalui membran polikarbonat 100 nm atau dengan cara sonikasi menggunakan *probe* atau sonikasi di dalam air akan menjadi lebih kecil (SUV=*Small Unilamellar Vesicle*)¹⁴⁻¹⁵. Untuk aplikasi kedokteran, digunakan liposom berukuran 80 sampai 200 nm¹⁶.

Purwaningsih, dkk mengembangkan komposisi terbaru liposom, yaitu liposom EPC-TEL2,5 yang mengandung lesitin/fosfatidilkolin kuning telur (EPC=*egg yolk phosphatidyl choline*) dan *tetraeter lipid* (TEL) 2,5 mol% dari *Sulfolobus acidophilum* yang merupakan hasil ekstraksi membran Archaea. Liposom ini dapat mengikat metilprednisolon palmitat lebih baik dan terbukti menunjukkan efek terapi, efek imunologik, serta terdistribusi dengan baik dalam organ secara berbeda bermakna dibandingkan metilprednisolon tanpa liposom¹⁷⁻¹⁹. Tetapi, liposom EPC-TEL2,5 pada penelitian ini digunakan TEL dari *Thermoplasma acidophilum* yang belum pernah diteliti kestabilannya terutama secara fisik.

Penelitian ini berpayung pada penelitian yang dilakukan oleh Purwaningsih dkk., terhadap formulasi terbaru liposom EPC-TEL2,5 hasil sonikasi, ekstrusi dan tanpa perlakuan (kontrol) yang disimpan pada suhu 4°C hingga hari ke-84. Parameter yang digunakan adalah perbedaan rerata jumlah liposom dengan diameter ≤ 100 nm dan > 100 nm.

Suhu penyimpanan 4°C dipilih karena pada umumnya sediaan dalam bentuk sediaan obat yang nantinya digunakan untuk obat suntik disimpan pada suhu tersebut.

1.2. Rumusan Masalah

1. Belum tersedia bentuk sediaan obat yang lebih efektif dan lebih aman untuk terapi jangka panjang, misalnya pada SLE, artritis reumatik, dan

pascatransplantasi organ. Terapi pada beberapa penyakit tersebut membutuhkan dosis tinggi sehingga toksisitas dan efek samping obat juga tinggi.

2. Liposom sebagai pembawa obat (*drug carriers*) secara umum terbukti meningkatkan efektivitas dan menurunkan efek samping obat. Namun hingga saat ini belum pernah dilakukan uji stabilitas fisik terhadap liposom EPC-TEL_{2,5} hasil sonikasi dan ekstrusi yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari.

1.3. Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan uraian pada latar belakang masalah di atas, secara garis besar terdapat sebuah pertanyaan penelitian, yaitu apakah liposom EPC-TEL_{2,5} hasil sonikasi dan ekstrusi tetap stabil dibandingkan kontrol yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari?

1.4. Hipotesis

Liposom EPC-TEL_{2,5} hasil sonikasi dan ekstrusi tetap stabil dibandingkan kontrol yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari.

1.5. Tujuan Penelitian

1.5.1. Tujuan umum

Membuktikan kestabilan liposom EPC-TEL_{2,5} secara fisik .

1.5.2. Tujuan khusus

1. Menguji stabilitas fisik liposom EPC-TEL_{2,5} hasil ekstrusi dengan diameter \bar{O} 100 nm yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari.
2. Menguji stabilitas fisik liposom EPC-TEL_{2,5} hasil ekstrusi dengan diameter > 100 nm yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari.

3. Menguji stabilitas fisik liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan diameter ≤ 100 nm yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari.
4. Menguji stabilitas fisik liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan diameter > 100 nm yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari.

1.6. Manfaat Penelitian

1. Apabila liposom EPC-TEL2,5 hasil sonikasi dan ekstrusi tetap stabil dibandingkan kontrol yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari, maka liposom formulasi terbaru tersebut dapat dimanfaatkan untuk menginkorporasikan beberapa golongan obat yang digunakan dalam terapi pada penyimpanan selama 84 hari pada suhu 4°C .
2. Kestabilan formulasi liposom EPC-TEL2,5 hasil sonikasi dan ekstrusi dan bermanfaat bagi perkembangan bidang nanoteknologi untuk terapi jangka panjang, terutama bagi industri farmasi.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Liposom

2.1.1. Sejarah Liposom

Struktur dan kegunaan liposom pertama kali ditemukan oleh Alec Bangham dari Cambridge pada awal tahun 1960, namun liposom sebagai pembawa obat telah dipatenkan di Jerman pada tahun 1943 berupa campuran cair antara lesitin dan kolesterol²⁰.

Pada tahun 1960-an dan 1970-an, berbagai metode pembuatan liposom telah dikembangkan untuk mempelajari proses biologis membran dan ikatan protein membran. Pada tahun 1970-an, liposom diusulkan sebagai pembawa obat untuk modifikasi indeks terapeutik obat, yaitu dengan mengurangi toksisitas atau meningkatkan efikasi (atau keduanya) dari obat induk²¹.

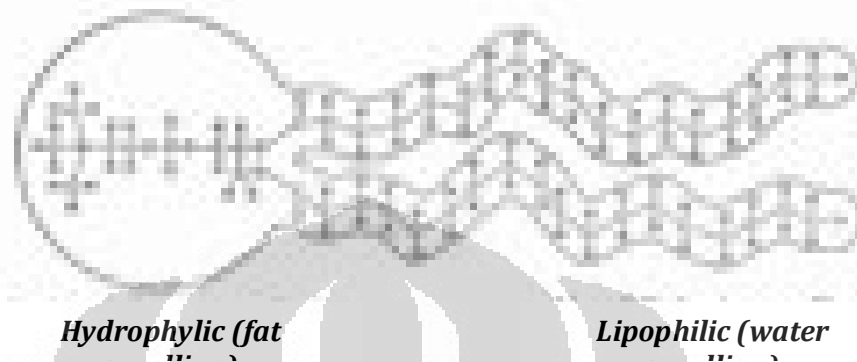
2.1.2. Definisi dan Komponen Penyusun Liposom

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. Persyaratan untuk suatu pembawa obat adalah: tidak toksik, tidak bersifat imunogenik, mutagenik, ataupun antimutagenik, biokompatibel dan mudah terdegradasi dalam tubuh²⁰⁻²².

Fosfolipid merupakan komponen struktural membran biologik yang terutama terdiri atas fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, dan fosfatidilinositol. Dengan teknik-teknik tertentu, masing-masing komponen tersebut saat ini sudah tersedia dalam bentuk ekstrak murni dari kuning telur, jaringan otak, kedelai ataupun dalam bentuk sintesisnya. Dari kombinasi berbagai komponen membran tersebut liposom dapat dibuat dan telah diuji efeknya sebagai pembawa berbagai obat secara *in vitro* dan *in vivo*, topikal atau parenteral.

Struktur molekuler dari fosfolipid terdiri atas sebuah kepala yang bersifat

hidrofilik atau menyukai air dan dua buah ekor yang bersifat lipofilik atau menyukai minyak (Gambar 2.1).



Gambar 2.1. Struktur molekuler fosfolipid²³

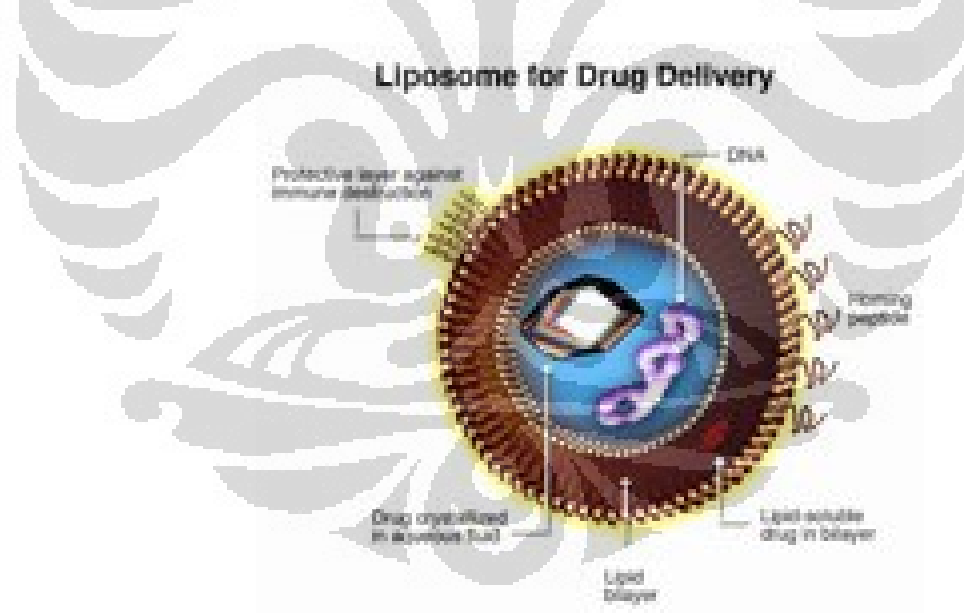
Fosfolipid yang lazim digunakan dalam pembuatan liposom konvensional adalah lesitin (fosfatidilkolin) dari kuning telur (*Egg-yolk Phosphatidyl Choline* = EPC), jaringan otak, kedelai (*Soy-bean Phosphatidyl Choline* = SPC) atau yang dibuat secara sintetik. Lipid bermuatan seperti fosfatidilserin atau fosfatidilgliserol seringkali ditambahkan sebagai stabilisator. Kolesterol dapat ditambahkan untuk memperbaiki stabilitas mekanis dan untuk menurunkan kebocoran senyawa aktif melalui membran²⁴. Beberapa zat lain yang seringkali ditambahkan untuk meningkatkan stabilitas liposom antara lain adalah vitamin E, asam fosfatidat, kombinasi vitamin E dan vitamin A. Lipid lain yang dapat digunakan sebagai stabilisator membran liposom, yang saat ini masih belum banyak digunakan adalah tetraeter lipid (TEL) dari membran sel Archaea, yaitu antara lain *Thermoplasma acidophilum*²⁵⁻²⁶ dan *Sulfolobus acidocaldarius*¹³.

Diameter atau ukuran liposom sangat ditentukan oleh beberapa hal, antara lain: 1) Jenis lipid dan kombinasinya. Sebagai contoh, liposom yang terbuat dari campuran EPC dan kolesterol, berdiameter lebih besar (100-200 nm) dibandingkan liposom dari EPC saja (<100 nm). 2) Keseimbangan antara energi untuk membuka membran liposom, elastisitas kelengkungan liposom, dan jumlah energi yang tersebar, dan 3) Cara pembuatan. Ukuran liposom dapat bervariasi

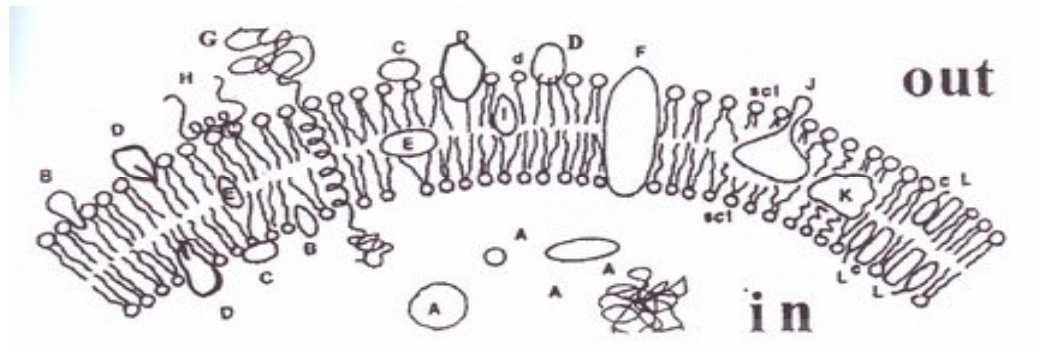
antara 20 nm hingga 100 μm dengan ketebalan dwilapis lipid sebesar 4 nm. Untuk aplikasi di bidang kedokteran, digunakan liposom berukuran 80-200 nm dan harus memenuhi ketepatan persyaratan yang meliputi: konsentrasi lipid dan obat, distribusi ukuran liposom, persentase molekul obat bebas yang tidak terinkorporasi pada membran liposom, pH, osmolaritas, konduktivitas, adanya kemungkinan produk hasil degradasi, endotoksin, dan parameter-parameter lainnya²².

2.1.3. Inkorporasi Obat pada Liposom dan Pembuatan Liposom

Sebagai pembawa obat, liposom dapat membawa molekul obat dengan berbagai cara, yaitu terikat dengan membran liposom, terinterkalasi di antara dwilapis lipid, terlarut dalam dwilapis lipid atau terlarut di dalam vesikel. Molekul obat dapat larut dalam air, terionisasi atau membentuk kompleks hidrofob dengan asam nukleat atau makromolekul lain tanpa berikatan secara fisik.



Gambar 2.2. Struktur liposom dengan berbagai kemungkinan cara obat terinkorporasi²⁷



Gambar 2.3. Gambaran interaksi antara obat dengan liposom secara skematik²⁰

A. Obat terlarut dalam vesikel; B. Interkalasi pada daerah polar; C. Adsorpsi pada permukaan membran; D. Terikat dengan rantai hidrofobik; E. Bereaksi secara kimia pada daerah hidrofobik; F dan G. Berasosiasi dengan dua lapis bagian hidrofobik; H. Adsorpsi sebagian; I. Berasosiasi dengan satu lapis bagian hidrofobik; J dan K. Obat yang sulit berikatan dengan membran liposom kecuali bila lipid berantai pendek (scl) atau lipid tidak jenuh berantai satu (d); L. Membentuk kompleks dengan komponen tertentu pada membran liposom (c).

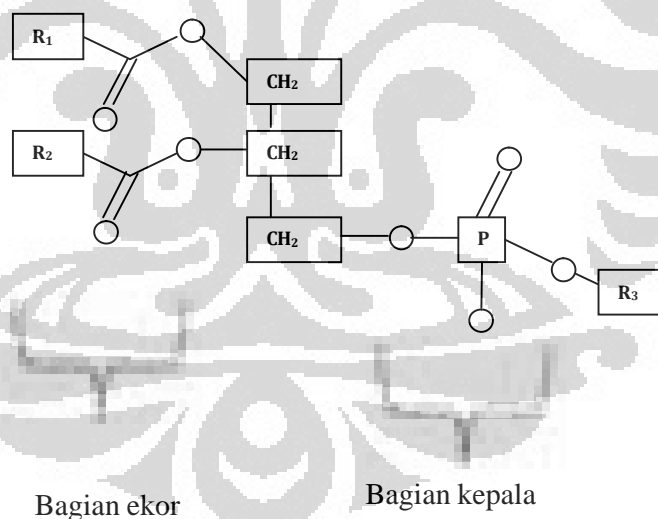
Persyaratan lain penggunaan liposom sebagai pembawa obat adalah stabilitas, baik fisik, kimia, maupun biologi dan jumlah lapisan membran lipid per liposom. Untuk bahan obat yang bersifat lipofil, bentuk liposom multilamellar merupakan pilihan utama, karena jumlah obat yang akan dibawa, yang terikat dengan membran, akan lebih banyak. Untuk bahan yang bersifat hidrofil, besarnya vesikel liposom, yang umumnya hanya terdiri atas satu lapis membran, menentukan jumlah obat yang akan dibawa²⁰.

Jumlah lapisan membran dan besar ukuran liposom ditentukan oleh cara pembuatannya. Liposom atau vesikel, yang dibuat dengan cara *hand-shaken* akan berbentuk multilamellar dan berukuran besar (*LMV = Large Multilamellar Vesicle*). Ukuran liposom tersebut dapat diperkecil menjadi *SUV = Small Unilamellar Vesicle* dengan cara mengekstrusikannya melalui membran

polikarbonat 100 nm atau dengan cara sonikasi menggunakan *probe* atau sonikasi di dalam air. Pembuatan liposom dengan cara dialisis terhadap *mixed-micelles* dengan detergen atau dengan cara *reverse phase evaporation*, *Freeze-thawing sonication*, perubahan pH dan penambahan kalsium, akan dihasilkan *LUV*. Sonikasi terhadap *LUV* akan dihasilkan *SUV*. Hasil yang sama dapat diperoleh dengan cara lain yaitu dengan *Freeze-Thawing*, *French Pressure cell* yang bertekanan tinggi dan metode injeksi secara cepat menggunakan etanol atau eter²⁸.

2.1.4. Muatan Permukaan Liposom

Berdasarkan pada komposisi bagian kepala lemak (Gambar 2.4) dan pH, liposom mempunyai tiga jenis muatan, yaitu negatif, netral, atau positif pada permukaannya. Sifat alami dan densitas muatan liposom mempengaruhi stabilitas, kinetika dan luasnya biodistribusi, serta interaksi ambilan antara liposom dengan sel target²⁹.



Gambar 2.4. Skema bagian kepala dan ekor lemak pada liposom³⁰

Liposom dengan permukaan bermuatan netral mempunyai kecenderungan yang lebih rendah untuk ditangkap oleh sel-sel *reticuloendothelial system* (RES) setelah pemberian sistemik, dan mempunyai kecenderungan yang sangat tinggi untuk menjadi agregat. Liposom yang bermuatan negatif mengandung

fosfatidilserin (PS) atau fosfatidilgliserol (PG). Liposom yang bermuatan negatif tersebut dikenal oleh berbagai reseptor yang terdapat pada permukaan sel, termasuk makrofag³¹. Pencampuran beberapa glikolipid, seperti gangliosida GM1 atau fosfatidilinositol (PI) pada liposom yang bermuatan negatif akan menyebabkan terhambatnya asupan liposom oleh makrofag dan sel-sel RES. Hal tersebut menyebabkan liposom mempunyai waktu sirkulasi yang lebih panjang³².

Liposom yang bermuatan positif atau liposom kationik sering digunakan sebagai reagen kondensasi DNA untuk penghantaran DNA dalam terapi gen. Liposom yang bermuatan positif tersebut mempunyai kecenderungan yang tinggi untuk berinteraksi dengan protein serum dan menyebabkan peningkatan asupan oleh RES serta peningkatan klirens oleh paru, hati, dan limpa³³.

2.2 Tetra Ether Lipid (TEL)

Tetra ether lipid merupakan salah satu produk hasil ekstraksi dari Archaea terutama yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum*, telah teruji tidak toksik dan tidak bersifat mutagenik atau antimutagenik, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*³⁴⁻³⁵. TEL yang berasal dari *Sulfolobus acidocaldarius*, walaupun sudah digunakan dalam penelitian namun belum teruji toksisitasnya seperti pada *Thermoplasma acidophilum*.

Lipid hasil ekstraksi membran dari Archae ini misalnya *Thermoplasma acidophilum* atau *Sulfolobus acidocaldarius*, berbeda secara nyata bila dibandingkan dengan fosfolipid pada membran sel lain yang membentuk dwi lapis 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 2.5.



Gambar 2.5: Membran liposom dari TEL yang terdiri atas satu lapis lipid²⁰

Keunggulan

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 pada Sulfolobus sangat resisten terhadap hidrolisis pada pH rendah sehingga memberi keuntungan lain dibandingkan 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 TEL dari *Archaea* tersebut bersifat stabil dengan ikatan yang cukup erat^{13, 24-26}.

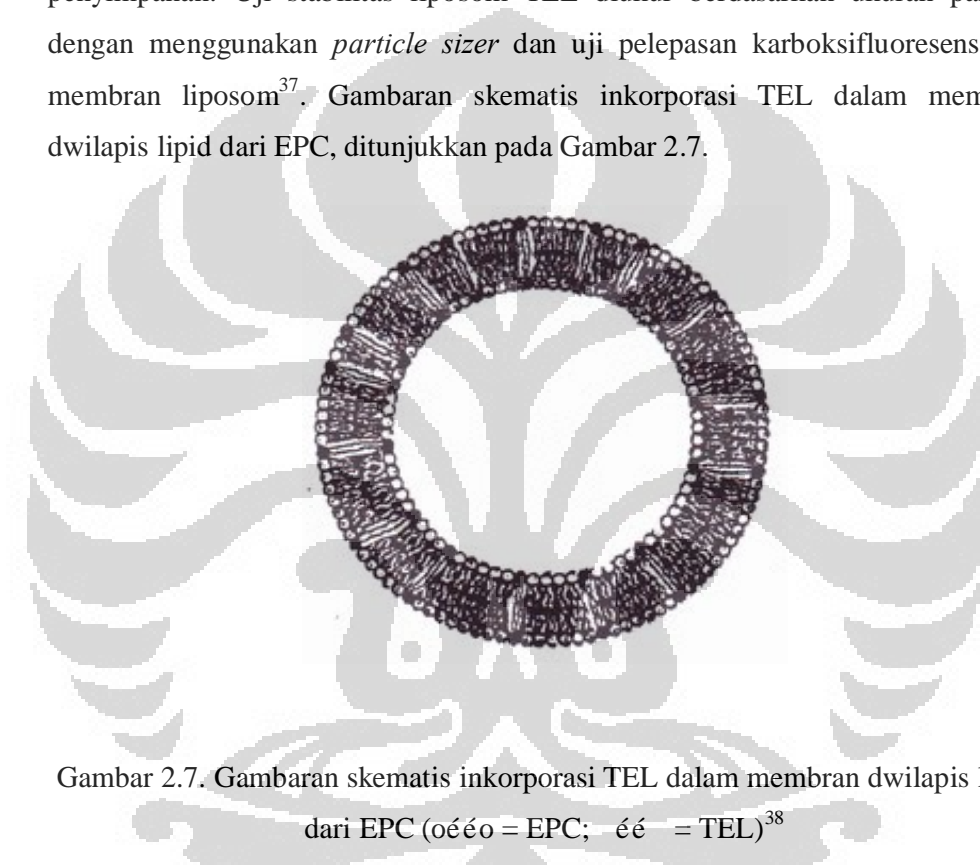
Gambar 2.6. TEL *Thermoplasma acidophilum*³⁶

Membran *T.acidophilum* terutama terdiri atas cincin dasar tetraeter. Pada suhu tinggi 59°C akan terbentuk pentasiklik secara simetris diantara rantai hidrokarbon yang lebih stabil dan menurunkan derajat rotasi bebas membran karena membran menjadi lebih tebal³⁷.

Hingga saat ini belum ada satu 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 intermembran 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^{9,37}.

Uji stabilitas liposom yang hanya terdiri atas TEL *T.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 berdasarkan ukuran partikel dengan nilai batas stabilitas 50%. Namun, ukuran partikel liposom membesar hingga 33% dari awal penyimpanan. Uji stabilitas liposom TEL diukur berdasarkan ukuran partikel dengan menggunakan *particle sizer* dan uji pelepasan karboksifluoresens dari membran liposom³⁷. Gambaran skematis inkorporasi TEL dalam membran dwilapis lipid dari EPC, ditunjukkan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7. Gambaran skematis inkorporasi TEL dalam membran dwilapis lipid dari EPC (oééo = EPC; éé = TEL)³⁸

Ukuran partikel liposom TEL, terutama dari *T.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 mencapai 7500 nm. Liposom hasil pengocokan tangan dapat diperkecil dengan cara a) sonikasi, menghasilkan liposom berukuran sekitar 600 nm, b) dialisis dengan detergen, membentuk liposom berukuran sekitar 370 - 450 nm dan c) ekstrusi melalui membran polikarbonat berpori 200 nm sehingga

ukuran liposom akan menjadi sekitar 220 nm.

Hasil penelitian terbaru oleh Patel dan kawan-kawan³⁹ pada *archaeosome* yaitu liposom yang terbuat dari membran Archaea lain yaitu *Methanosarcina mazei*, *Methanobacterium espanolae* dan *Thermoplasma acidophilum* menunjukkan bahwa vesikel multilamellar (*multilamellar vesicle*=MLV) dari *T.acidophilum*, in vitro, paling stabil di antara ketiga jenis Archaea tersebut. Penelitian ini juga membuktikan bahwa MLV dari ketiga jenis membran *Archaea* lebih stabil daripada bentuk ULV (*unilamellar vesicle*).

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 penyimpanan 4-8° C liposom tetap stabil hingga 622 hari walaupun ukuran partikel liposom membesar hingga 33% dari awal penyimpanan³⁷.

2.3 Temperatur

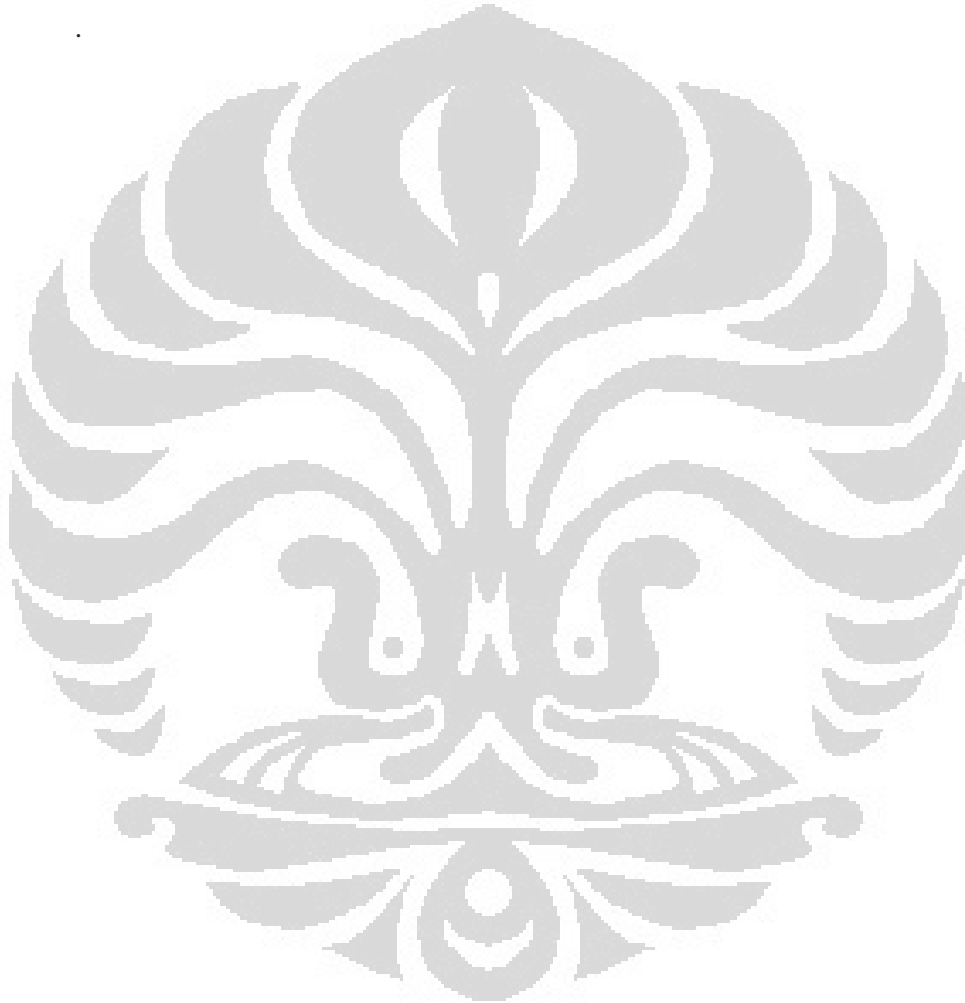
Temperatur adalah ukuran derajat atau kadar panasnya atau dinginnya suatu benda (objek). Hampir di seluruh dunia temperatur diukur pada skala Celsius. Pada sistem temperatur ini interval antara titik beku dan titik didih air dibagi menjadi 100 nilai, dengan titik beku 0°C dan titik didih 100°C.

Temperatur memiliki pengaruh terhadap panjang dan kerapatan benda (*thermal expansion*). Hampir seluruh substansi baik padat (*solid*), cair (*liquid*), maupun gas mengalami peningkatan ukuran seiring naiknya temperatur. Untuk objek padat efek pemuaian suhu ini tampak pada perubahan panjang atau perubahan volume. Untuk objek cair dan gas hanya perubahan volume yang berarti. Dengan menggunakan objek batang tembaga diketahui bahwa perubahan panjang meningkat secara linear terhadap perubahan temperatur.

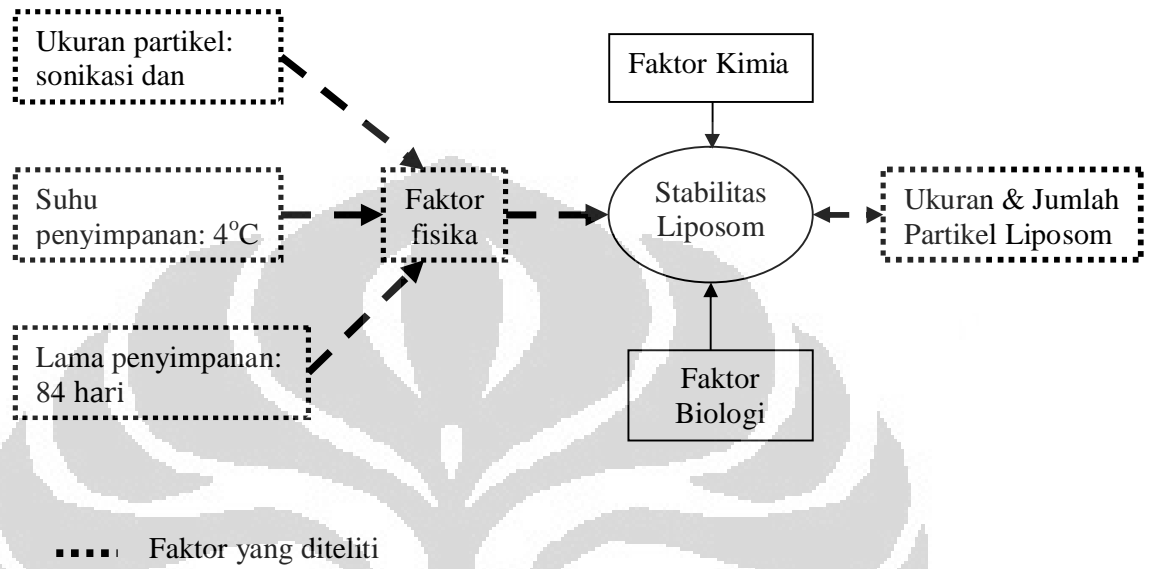
Perubahan temperatur tidak akan mempengaruhi massa sebuah objek tetapi

mempengaruhi volumenya. Peningkatan volume berarti menurunnya kerapatan, dan sebaliknya. Ada sedikit perbedaan sifat tersebut pada air. Kerapatan air menunjukkan peningkatan seiring naiknya temperatur dari suhu 0°C sampai 4°C .

Temperatur juga memiliki pengaruh terhadap pergerakan partikel di dalam objek. Semakin tinggi temperatur, semakin cepat pergerakan partikel tersebut.



2.4 Kerangka Konsep



3. METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental untuk menguji stabilitas fisik formulasi terbaru liposom EPC-TEL 2,5 sebagai pembawa obat.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan secara bertahap yaitu:

- Tahap I : 8 Mei 2007 (hari ke-0)
- Tahap II : 14 Mei 2007 (hari ke-7)
- Tahap III : 4 Juni 2007 (hari ke-28 atau akhir bulan pertama)
- Tahap IV : 2 Juli 2007 (hari ke-56 atau akhir bulan kedua)
- Tahap V : 30 Juli 2007 (hari ke-84 atau akhir bulan ketiga)

Penelitian ini dilaksanakan di tiga tempat, yaitu:

- Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI)
Jln. Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat 10430
- Departemen Farmakologi FKUI
Jln. Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat 10430
- Departemen Fisika Kedokteran
Jln. Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat 10430.

3.3 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

Dengan menggunakan rumus di atas dapat dilakukan perhitungan besar sampel sebagai berikut:

$t = 15$, karena dalam penelitian berkelompok terdapat tiga kelompok liposom, yaitu kelompok kontrol, sonikasi, dan ekstrusi. Ketiga kelompok liposom tersebut diamati secara bertahap sebanyak lima kali, yaitu pada hari ke-0, hari ke-7, hari ke-28, hari ke-56, dan hari ke 84.

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

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

$$(n-1) \geq 15/14$$

$$n \geq 2.07(\text{dibulatkan menjadi } 3)$$

Dengan demikian, dalam penelitian berkelompok minimal dibutuhkan sampel sebanyak 3 buah per kelompok.

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

- *Rotavapor-vacum pump-waterbath* Büchi
- Neraca listrik Mettler AE-200
- Spuit 2,5 mL dan 2,5 μ L
- Sentrifus (vertex)
- Ekstruder 200 nm
- Filter PC 200 nm
- Round bottom glass 1 liter yang berisi 30 *beads*
- *Bath sonicator* (Sonicator Branson tipe 1510)
- Inkubator (freezer 4° C)
- Kamera Sony MLD-IRIS *color video camera*

- Program Win USB TV *version 2.0*
- Komputer
- Mikroskop *ØOlympusØ*
- Gelas objek berskala *ØOlympusØ* beserta penutupnya
- Botol berukuran 20 mL (31 buah)
- Mikropipet
- Kertas parafilm
- Alumunium foil

3.4.2 Bahan

- Fosfatidilkolin dari kuning telur (*Egg-yolk Phosphatidylcholine/ EPC*) Lipoid[®]
- Tetra eter lipid (TEL) dari membran *Termoplasma acidophilum* yang diperoleh dari IFB Halle Jerman
- Kloroform
- Etanol 70%
- Etanol 98%
- Penanda bercak quinakrin dengan kadar 25 mg untuk tiap 50 gram lipid EPC yang diperoleh dari Departemen Biologi Kedokteran FKUI
- Aquabides
- Aquades
- Es batu

3.5 Cara Kerja

3.5.1. Perhitungan Liposom

Perhitungan yang digunakan dalam pembuatan liposom EPC-TEL 2,5 adalah sebagai berikut:

BM 1 mol EPC	780 g/l
BM 1 mmol EPC	0,78 g/l atau 0,78 mg/ml

BM 1 mol TEL	1488,4 g/l
BM 1 mmol TEL	1,4884 g/l atau 1,4884 mg/ml

1. Perhitungan Jumlah EPC

Ketetapan 1: dalam 1 mL larutan liposom terdapat 10 mmol EPC

Dalam penelitian ini setiap peneliti membutuhkan 10 mL larutan liposom. Dalam 1 mL larutan liposom terdapat 10 mmol EPC. Dengan demikian dalam penelitian ini setiap peneliti membutuhkan EPC sebanyak 100 mmol. Karena penelitian ini dilaksanakan oleh lima orang, maka total EPC yang digunakan untuk membuat liposom dengan formulasi terbaru adalah 500 mmol (= 0,5 mol)

Jumlah EPC yang dibutuhkan untuk membuat liposom EPC-TEL2,5 (dalam mg) adalah $500 \text{ mmol} \times 0,78 \text{ (BM)} = 390 \text{ mg EPC}$.

2. Perhitungan Jumlah TEL

Ketetapan 2: jumlah mol TEL yang terdapat dalam EPC-TEL2,5 adalah 2,5% dari mol EPC

$$\begin{aligned} \text{mol TEL} &= 2,5/100 \times 0,5 \text{ mol EPC} \\ &= 0,0125 \text{ mol} \end{aligned}$$

Dengan demikian jumlah TEL yang dibutuhkan untuk membuat liposom formulasi terbaru (dalam mg) adalah:

$$\text{Massa} = \text{mol TEL} \times \text{BM TEL}$$

$$0,0125 \times 1448,4 = 18,105 \text{ mg.}$$

Dengan demikian, jumlah TEL yang diperlukan untuk membuat liposom EPC-TEL2,5 untuk lima orang adalah 18,105 mg.

Pembuatan liposom dilakukan dengan menggunakan *rotavapor-vacuum pump-waterbath Büchi*. Liposom yang berbentuk lapisan putih tipis pada dasar labu kemudian dilarutkan dengan akubides sebanyak 50 mL. Selanjutnya quinakrin ditambahkan ke dalam larutan liposom.

Quinakrin yang tersedia masih dalam bentuk sediaan padat. Oleh karena itu quinakrin harus dibuat menjadi larutan quinakrin. Perhitungannya adalah sebagai berikut:

3. Perhitungan Jumlah Quinakrin

Ketetapan 3: untuk setiap 5 g EPC dibutuhkan 25 mg quinakrin.

Jumlah quinakrin yang dibutuhkan dalam 390 mg EPC adalah sebagai berikut:

$$\text{Jumlah quinakrin} = (390 \text{ mg}/50.000\text{mg}) \times 25 \text{ mg}$$

Dengan demikian, jumlah quinakrin yang dibutuhkan untuk 390 mg EC adalah 0,195 mg.

3.5.2 Pembuatan Preparasi Liposom

1. Semua alat yang akan digunakan dicuci dengan etanol 70%, kemudian dengan aquades lalu dengan etanol 98%, setelah itu dikeringkan.
2. Lakukan penimbangan EPC dan TEL sesuai hasil perhitungan di atas (kadar TEL=2,5% dari EPC). Campurkan kedua bahan tersebut.
3. Dalam tabung yang lain dibuat campuran etanol 98% dan kloroform dengan volume sama. 1 mL larutan campuran tersebut diambil untuk melarutkan EPC dan TEL.
4. Masukkan air ke dalam *Waterbath Büchi* sampai seperempat bagian dari *round bottom glass* terendam dan panaskan dengan suhu mencapai 40°C.
5. Tuang campuran EPC dan TEL tersebut ke dalam *round bottom glass* yang

berisi *beads* (untuk memudahkan pencampuran).

6. Pasang *round bottom glass* ke *Rotavapor-Vacuum-Waterbath Büchi*. Nyalakan tombol pemutar, mesin vakum, atur perlahan hingga tekanan mencapai 200 milibar kemudian nyalakan mesin pendingin.



Gambar 3.1. Büchi Rotavapor

7. Tunggu sampai larutan di dalam *round bottom glass* terevaporasi dan terdispersi (timbul lapisan tipis). Kemudian turunkan tekanan secara perlahan sampai berada di bawah 50 milibar.
8. Hentikan proses pembuatan bila sudah tidak tercium lagi aroma campuran kloroform dan etanol dalam *round bottom glass*.



Gambar 3.2. Liposom yang telah mengering.

Liposom EPC-TEL2,5 yang telah selesai dibuat dan dapat dikeringkan dengan *Rotavapor-Vacuum pump-Waterbath Büchi* dapat disimpan selama beberapa minggu dalam suhu 4°C.

9. Saat akan digunakan, liposom diencerkan terlebih dahulu dengan *aquabides* 50 mL dan dikocok dengan tangan maupun *vertex* hingga larut.

10. Preparasi liposom ini dibagi secara merata ke dalam 3 botol, yaitu:

- Botol 1: berisi kelompok liposom kontrol (tanpa perlakuan),
- Botol 2: berisi kelompok liposom yang telah diekstrusi dengan ekstruder 200 nm,
- Botol 3: berisi larutan liposom yang telah disonikasi dengan *bath sonicator* selama satu jam, dengan diberi jeda setiap 15 menit. Proses sonikasi dilakukan di Departemen Farmakologi dan Terapi FKUI.



Gambar 3.3. Liposom yang sedang disonikasi



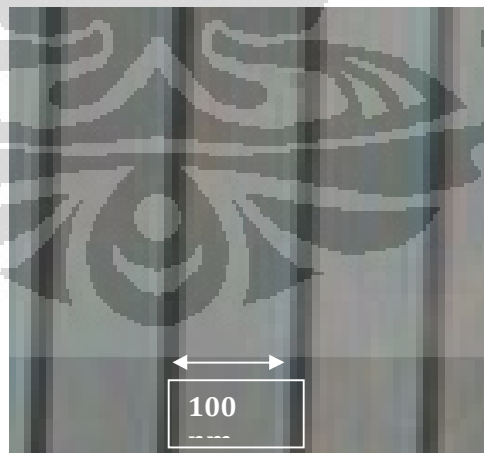
Gambar 3.4. Liposom yang sedang diekstrusi

11. Selanjutnya dilakukan pembuatan larutan quinakrin sesuai dengan perhitungan di atas.
12. Tambahkan larutan quinakrin pada ketiga botol tersebut.
13. Tiga botol yang masing-masing berisi liposom tanpa perlakuan, liposom yang telah diekstrusi dengan ekstruder 200 nm dan liposom yang telah disonikasi diinkubasi dengan suhu 4°C selama 84 hari di Departemen Farmasi Kedokteran, FKUI.
14. Lakukan pengamatan terhadap ketiga kelompok liposom ada hari 0, hari ke-7, hari ke-28, hari ke-56 hari ke-84.

3.5.3 Pengamatan Liposom

Pengamatan terhadap ketiga kelompok liposom dilakukan pada hari ke-0, hari ke-7, hari ke-28, hari ke 56, dan hari ke-84. Pada setiap pengamatan, masing-masing kelompok liposom ditetaskan pada kaca objek sebanyak 25 μL . Kemudian ditutup dengan kaca penutup dan diamati dengan *image processing unit* yang terdiri atas *CCD camera*, komputer, dan mikroskop dengan pembesaran 10 x 40 kali. Dalam pengamatan tersebut dilakukan pengambilan 10 foto pada 10 lapang pandang per satuan waktu serta pengambilan video selama 15 detik.

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah jumlah dan diameter liposom yang diukur secara manual menggunakan kaca objek berskala $\mu\text{Olympus}$ di bawah mikroskop. Dalam penelitian ini terdapat dua kategori ukuran diameter liposom, yaitu $\leq 100 \text{ nm}$ dan $> 100 \text{ nm}$. Berdasarkan rumus Federer, perhitungan jumlah dan diameter liposom minimal dilakukan sebanyak 3 kali. Dalam penelitian ini perhitungan dilakukan sebanyak 4 kali. Liposom memiliki ciri yang dapat dibedakan dari quinakrin, yaitu tampak seperti halo, tidak transparan terhadap cahaya, dan gerak *Brown*. Liposom yang dimasukkan dalam perhitungan pengamatan ialah yang berbentuk bundar dengan permukaan mulus, tidak bertumpuk dan tidak bergumpal.



Gambar 3.5. Foto skala $\mu\text{Olympus}$ pembesaran 400x

Liposom dinyatakan stabil apabila secara statistik tidak terdapat perbedaan bermakna antara jumlah dan diameter liposom kelompok perlakuan (hasil ekstrusi

atau hasil sonikasi) dengan liposom kelompok kontrol dari hasil pengamatan selama 84 hari. Namun, apabila secara statistik terdapat perbedaan bermakna maka liposom tersebut dinyatakan tidak stabil.

3.6. Identifikasi Variabel

Variabel bebas : sonikasi, ekstrusi 200 nm, lama waktu penyimpanan

Variabel terikat : jumlah dan diameter partikel liposom

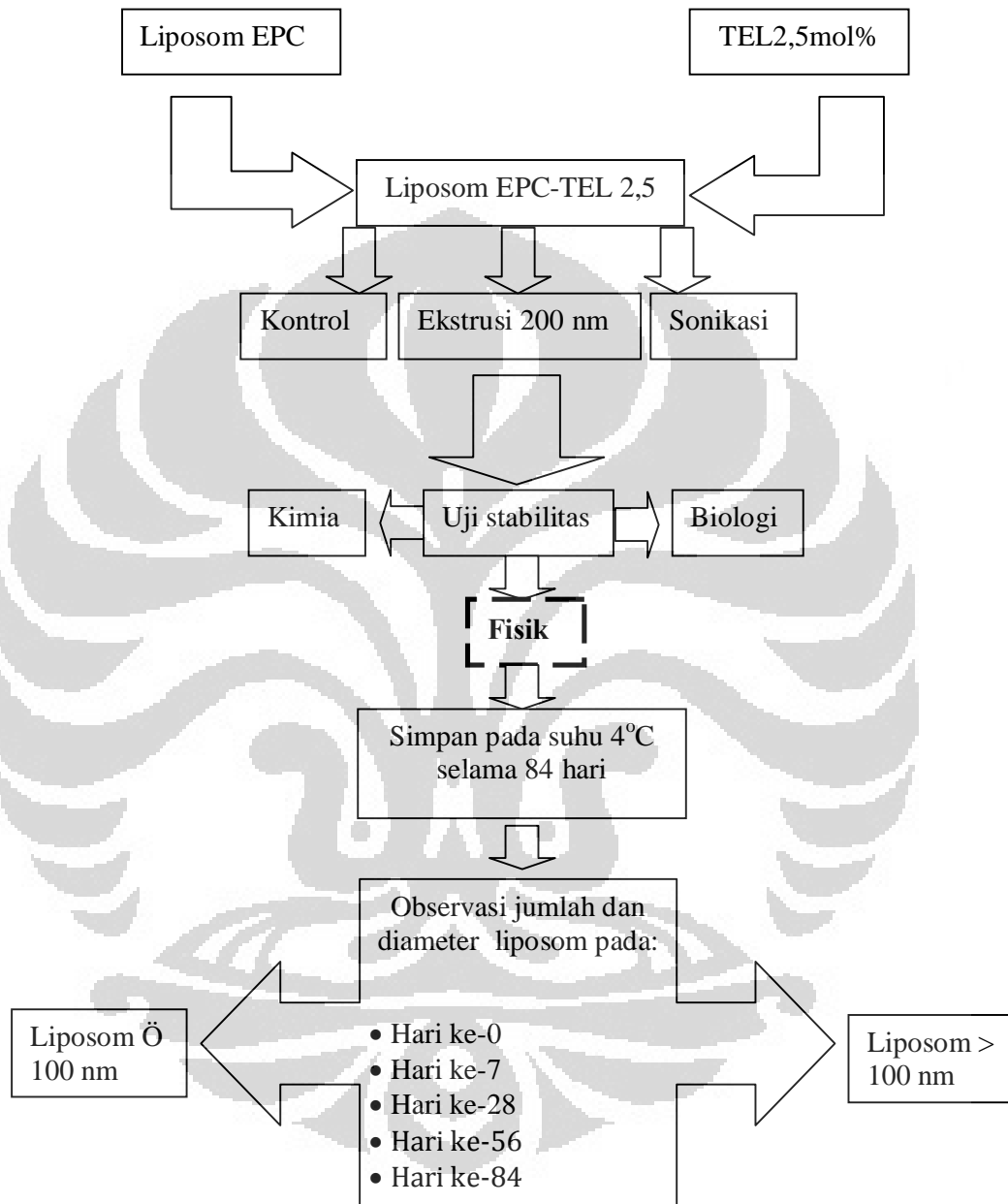
3.7. Manajemen dan Analisis Data

Pengukuran diameter partikel liposom dilakukan berdasarkan kategori lebih kecil dari 100 nm, sama dengan 100 nm dan lebih besar dari 100 nm. Dengan demikian skala pengukuran merupakan skala ordinal. Uji statistik yang digunakan adalah uji non parametrik. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis dan analisis *post hoc* Mann-Whitney. Untuk kelompok yang memiliki perbedaan bermakna pada uji Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan analisis *post hoc* Mann-Whitney. Batas kemaknaan () adalah 5% atau $p < 0,05$. Pengolahan data dilakukan dengan program *software* SPSS versi 11.5.

3.8 Definisi Operasional

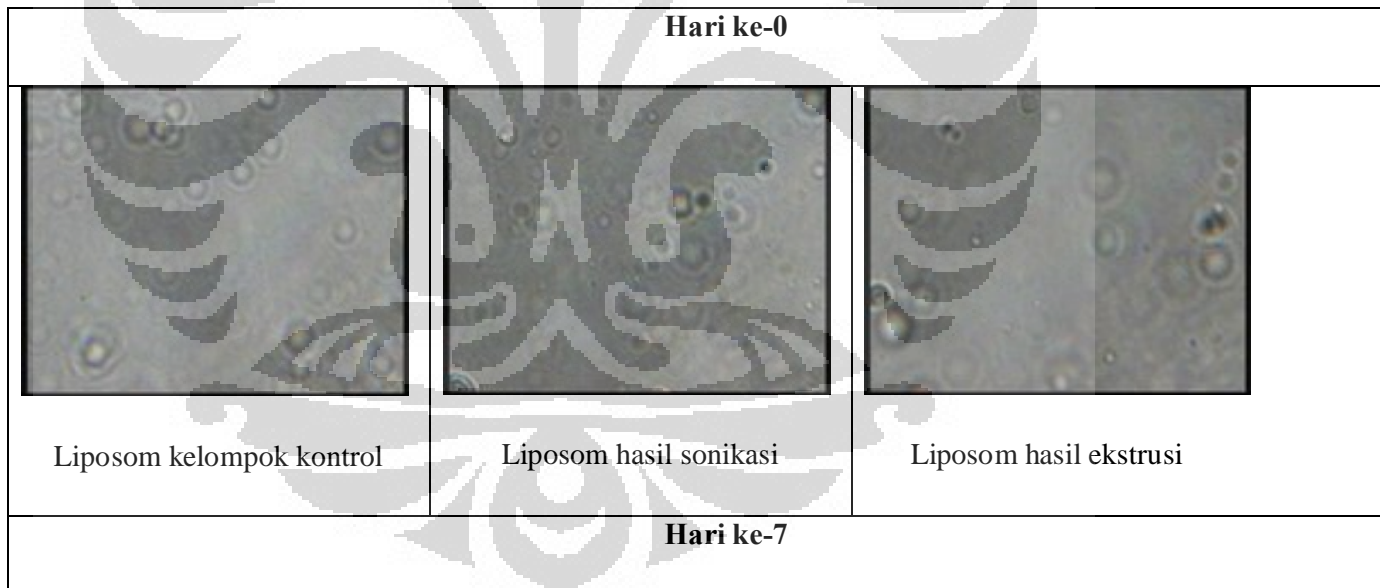
1. Tetra eter lipid (TEL) yang digunakan dalam penelitian ini adalah TEL yang diekstraksi dari bakteri *Thermoplasma acidophilum*.
2. EPC-TEL 2,5 adalah suatu bentuk liposom yang merupakan kombinasi *egg yolk phosphatidilcholine* (EPC) dengan TEL, yang konsentrasinya 2,5 mol% dari konsentrasi EPC.
3. Uji stabilitas fisik: mengukur diameter dan jumlah liposom. Liposom dinyatakan stabil apabila secara statistik tidak terdapat perbedaan bermakna antara jumlah dan diameter liposom kelompok perlakuan (hasil ekstrusi atau hasil sonikasi) dengan liposom kelompok kontrol dari hasil pengamatan selama 84 hari.. Namun, apabila secara statistik terdapat perbedaan bermakna maka liposom tersebut dinyatakan tidak stabil.


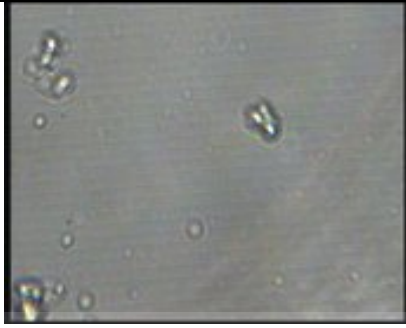
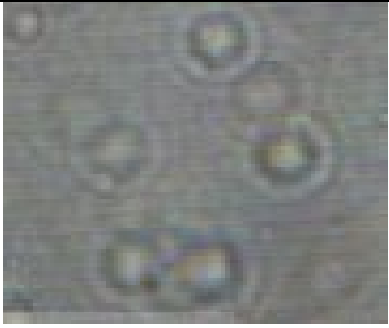
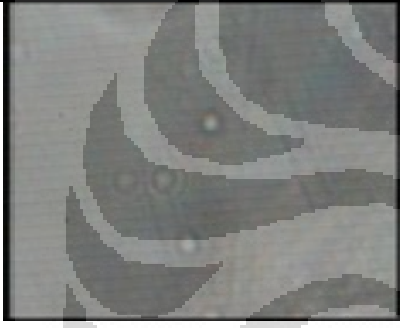




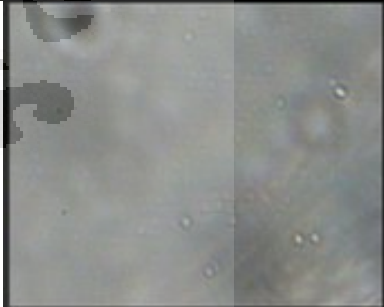
3.9 Alur Penelitian

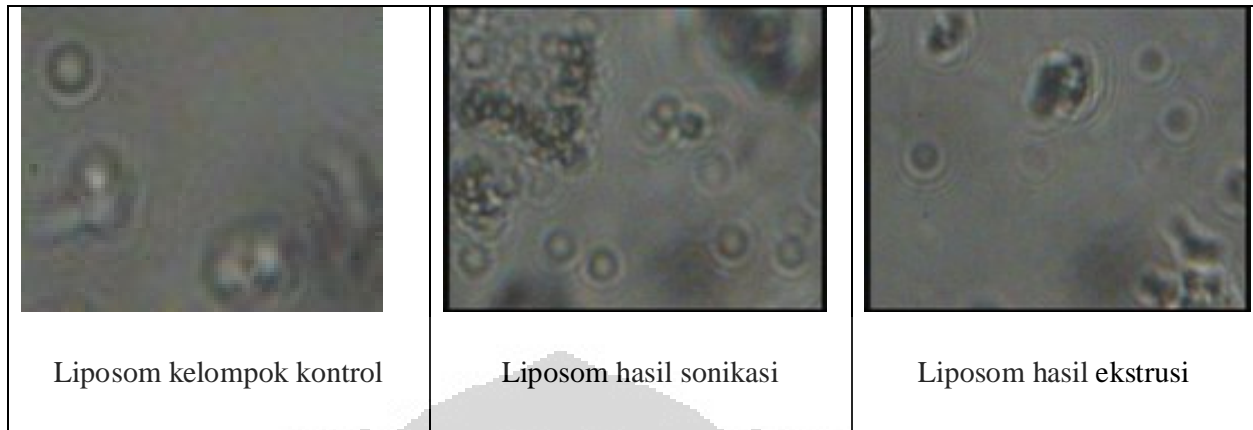


4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, hasil perhitungan liposom dikategorikan menjadi dua, yaitu liposom dengan ukuran diameter ≤ 100 nm dan liposom dengan ukuran diameter > 100 nm. Hasil penelitian tersebut kemudian dianalisis dengan program *software* SPSS versi 11.5. Karena hasil penelitian ini tergolong data kategorik (ordinal), lebih dari dua kelompok, dan tidak berpasangan, maka uji hipotesis yang digunakan adalah uji non-parametrik Kruskal-Wallis, dengan batas kemaknaan $p=0,05$. Hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 4.1, yang menunjukkan jumlah liposom yang berdiameter ≤ 100 nm dan > 100 nm pada kelompok liposom kontrol (tanpa perlakuan), liposom yang disonikasi, dan liposom yang diekstrusi pada hari ke-0, hari ke-7, hari ke-28, hari ke-56, dan hari ke-84 (lihat Gambar 4.1 dan Tabel 4.1)



		
Liposom kelompok kontrol	Liposom hasil sonikasi	Liposom hasil ekstrusi
Hari ke-28		
		
Liposom kelompok kontrol	Liposom hasil sonikasi	Liposom hasil ekstrusi
Hari ke-56		
		
Liposom kelompok kontrol	Liposom hasil sonikasi	Liposom hasil ekstrusi
Hari ke-84		



Gambar 4.1. Foto liposom pada hari ke-0, hari ke-7, hari ke-28, hari ke-56 dan hari ke-84 (pembesaran 400x)

Dengan uji Kruskal-Wallis, untuk liposom yang berdiameter ≤ 100 nm diperoleh nilai probabilitas 0,000 ($p < 0,001$), sedangkan untuk liposom yang berdiameter > 100 nm diperoleh nilai probabilitas 0,017 ($p = 0,017$). Karena nilai $p < 0,05$ untuk liposom yang berdiameter ≤ 100 nm maupun diameter > 100 nm maka terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok liposom tersebut (kontrol, ekstrusi atau sonikasi) pada suhu penyimpanan 4°C selama tiga bulan. Untuk melihat perbedaan tersebut dilakukan uji analisis *post hoc* dengan Mann-Whitney. Hasilnya :

- 1.) Pada liposom diameter ≤ 100 nm hasil ekstrusi pada penyimpanan 4°C selama 84 hari terdapat perbedaan bermakna dibandingkan dengan liposom kontrol ($p = 0,008$);
- 2.) Pada liposom diameter > 100 nm hasil ekstrusi pada penyimpanan 4°C selama 84 hari terdapat perbedaan bermakna dibandingkan dengan liposom kontrol ($p = 0,007$);
- 3.) Pada liposom diameter ≤ 100 nm hasil sonikasi pada penyimpanan 4°C selama 84 hari tidak terdapat perbedaan bermakna dibandingkan dengan liposom kontrol ($p = 0,935$);
- 4.) Pada liposom diameter ≥ 100 nm hasil sonikasi pada penyimpanan 4°C selama 84 hari tidak terdapat perbedaan bermakna dibandingkan dengan liposom kontrol ($p = 0,242$).

Tabel 4.1. Hasil pengamatan jumlah dan diameter liposom EPC-TEL2,5 kontrol, hasil ekstrusi dan hasil sonikasi pada inkubasi suhu 4°C

Waktu Pengamatan		Kelompok Kontrol		Kelompok Perlakuan			
				Ekstrusi		Sonikasi	
		≤ 100 nm	> 100 nm	≤ 100 nm	> 100 nm	≤ 100 nm	> 100 nm
Hari ke-0	Data I	197	5	84	5	159	1
	Data II	145	0	41	23	114	0
	Data III	382	0	124	18	282	0
	Data IV	195	1	68	6	147	1
	Rata-rata	229,75	1,5	79,25	13	175,5	0,5
Hari ke-7	Data I	237	4	136	8	240	1
	Data II	377	7	114	7	246	0
	Data III	332	0	209	40	236	0
	Data IV	199	0	383	4	115	0
	Rata-rata	286,25	3,25	210,5	14,75	209,25	0,25
Akhir Bulan I	Data I	74	0	71	1	47	8
	Data II	119	5	103	8	112	0
	Data III	100	2	87	4	68	0
	Data IV	65	1	44	3	30	0
	Rata-rata	89,5	2	76,25	4	64,25	2
Akhir Bulan II	Data I	153	0	122	0	502	2
	Data II	181	1	179	4	239	0
	Data III	136	0	131	0	412	0
	Data IV	175	0	72	0	380	0
	Rata-rata	161,25	0,75	126	2	383,25	1
Akhir Bulan III	Data I	128	9	60	4	124	0
	Data II	113	0	33	10	111	2
	Data III	103	0	50	0	110	0

	Data IV	57	0	28	2	81	0
	Rata-rata	100,25	2,25	42,75*	4*	106,5	0,5

* $p < 0,05$ dibandingkan kontrol

Oleh karena nilai $p < 0,05$ (untuk liposom hasil ekstrusi baik yang berdiameter \bar{O} 100 nm atau > 100 nm), maka terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok-kelompok liposom tersebut pada penyimpanan selama tiga bulan. Hal tersebut berarti liposom hasil ekstrusi yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari bersifat tidak stabil, baik untuk yang berdiameter \bar{O} 100 nm maupun > 100 nm. Sedangkan nilai $p > 0,05$ (untuk liposom hasil sonikasi baik yang berdiameter \bar{O} 100 nm atau > 100 nm), maka tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok-kelompok liposom tersebut pada penyimpanan selama 84 hari. Hal tersebut berarti liposom hasil sonikasi yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari bersifat stabil, baik untuk yang berdiameter \bar{O} 100 nm maupun > 100 nm.

Ditinjau dari lipid yang digunakan untuk pembuatan liposom pada penelitian ini, EPC (*Egg yolk Phosphatidyl-choline*) adalah bahan yang lazim digunakan untuk pembuatan liposom konvensional yang telah teruji efektif sebagai pembawa obat dari berbagai obat secara *in vitro* maupun *in vivo*³⁷. Penambahan TEL (*tetraeter lipid*) yang dilakukan pada penelitian ini, yang mempunyai struktur *monolayer*, membentuk pasak dalam membran liposom EPC yang berfungsi sebagai penstabil membran. Dipilihnya TEL sebagai penstabil membran, karena TEL mempunyai struktur berupa dua gugus kepala polar dengan tebal membran sekitar 4 nm, sehingga diharapkan akan dapat berinkorporasi dengan membran liposom EPC. Selain itu, TEL juga dapat menambah muatan negatif pada permukaan membran liposom terutama yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum*³⁷. Liposom yang bermuatan netral lebih mudah mengalami agregasi karena adanya ikatan Van der Waals, hal ini tidak terjadi pada liposom bermuatan. TEL juga mempunyai ikatan eter yang resisten terhadap hidrolisis. Dengan demikian penambahan TEL pada liposom diharapkan dapat meningkatkan kestabilan liposom.

Salah satu faktor yang mempengaruhi ukuran liposom adalah komposisi lipid yang menyusun liposom. Kombinasi antara EPC dan TEL pada berbagai rasio (w/w), yaitu 75:25, 50:50, dan 25:75, akan menghasilkan liposom dengan ukuran yang cukup besar, yaitu 169-792 nm³⁷. Liposom yang berukuran besar tersebut tentunya harus diperkecil ukurannya untuk mencegah degradasi yang berlebihan oleh sel-sel RES. Terdapat beberapa cara untuk memperkecil ukuran liposom, yaitu dengan cara sonikasi dan ekstrusi. Namun, sonikasi akan meningkatkan terjadinya oksidasi lipid, sehingga liposom menjadi tidak stabil⁴⁰. Karena dalam penelitian ini digunakan TEL yang dikombinasikan dengan EPC, efek oksidasi lipid yang ditimbulkan oleh sonikasi dapat dicegah. Hal tersebut disebabkan oleh ketiadaan ikatan rangkap dalam struktur TEL yang akan meningkatkan resistensi terhadap oksidasi.

Uji stabilitas liposom yang hanya terdiri atas TEL dari *Thermoplasma acidophilum* saja menunjukkan bahwa TEL ini cukup stabil pada pH netral ataupun alkalis, yaitu selama 109 minggu pada suhu 4-8°C dan selama 10 minggu pada suhu 100°C³⁷.

Liposom hasil kombinasi TEL dan EPC dengan berbagai rasio, yaitu 75:25, 50:50, dan 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 *particel sizer* dan uji penglepasan karboksi fluoresens dari membran liposom³⁷. Pada beberapa penelitian lain tentang kombinasi TEL *Thermoplasma acidophilum* dan EPC dibuktikan bahwa liposom hasil kombinasi tersebut bersifat stabil. Uji stabilitas berdasarkan ukuran partikel dengan nilai batas stabilitas sebesar 50% menunjukkan bahwa liposom hasil kombinasi tersebut tetap stabil hingga 622 hari pada suhu penyimpanan 4-8°C, walaupun ukuran partikel liposom membesar hingga 33% dari awal penyimpanan³⁷. Hal tersebut disebabkan oleh penambahan muatan negatif pada permukaan membran liposom oleh TEL, sehingga liposom kombinasi TEL dan EPC tetap stabil⁴¹.

Preparasi Liposom EPC-TEL_{2,5} dengan konsentrasi TEL 2,5 mol% dari EPC memiliki potensi keamanan penggunaan yang lebih tinggi daripada liposom

EPC-TEL preparasi yang pernah ada. Preparasi Liposom EPC-TEL_{2,5} memiliki massa TEL yang lebih kecil daripada liposom EPC-TEL yang telah diteliti oleh Freisleben. TEL sendiri merupakan struktur membrane bakteri *Archae* yang merupakan benda asing bagi tubuh manusia sehingga semakin kecil kandungan TEL yang digunakan pada preparasi liposom maka potensi toksiknya lebih kecil. Namun, sampai saat ini belum ada uji degradasi dan ekskresinya.

Berdasarkan berbagai penelitian tentang uji toksisitas pada kedua lipid tersebut, terbukti bahwa baik EPC maupun TEL tidak toksik dan tidak mutagenik³⁷, maka pemakaian liposom EPC-TEL_{2,5} hasil sonikasi dengan kategori diameter ≤ 100 nm maupun > 100 nm pada suhu penyimpanan 4°C diharapkan cukup aman untuk pemakaian jangka panjang.

Kekurangan penelitian ini adalah pengambilan data yang kurang sensitif karena ukuran diameter liposom hanya dikategorikan menjadi dua kelompok, yaitu ≤ 100 nm dan > 100 nm, sehingga analisis statistik juga kurang sensitif. Hal ini disebabkan tidak tersedianya *partikel sizer* atau program komputer yang dapat mengukur diameter secara pasti, misalnya dengan program *image pro-plus*, sehingga dapat diperoleh data ukuran liposom yang lebih pasti dan dapat dilakukan analisis data secara parametrik yang lebih sensitif.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan uraian pada hasil penelitian dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan bahwa:

1. Liposom EPC-TEL2,5 hasil ekstrusi dengan diameter ≤ 100 nm yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari bersifat tidak stabil dibandingkan dengan liposom kontrol, karena secara statistik terdapat perbedaan yang bermakna dalam hal jumlah dan ukuran diameter liposom ($p=0,008$).
2. Liposom EPC-TEL2,5 hasil ekstrusi dengan diameter > 100 nm yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari bersifat tidak stabil dibandingkan dengan liposom kontrol, karena secara statistik terdapat perbedaan yang bermakna dalam hal jumlah dan ukuran diameter liposom ($p=0,007$).
3. Liposom EPC-TEL2,5 hasil sonikasi dengan diameter ≤ 100 yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari tetap stabil dibandingkan dengan liposom kontrol, karena secara statistik tidak terdapat perbedaan yang bermakna dalam hal jumlah dan ukuran diameter liposom ($p=0,935$).
4. Liposom EPC-TEL2,5 hasil sonikasi dengan diameter ≤ 100 yang disimpan pada suhu 4°C selama 84 hari tetap stabil dibandingkan dengan liposom kontrol, karena secara statistik tidak terdapat perbedaan yang bermakna dalam hal jumlah dan ukuran diameter liposom ($0,242$).

5.2 Saran

Untuk mengukur diameter liposom sebaiknya digunakan *particle sizer* atau program komputer yang dapat mengukur diameter liposom secara pasti, misalnya dengan program *image pro-plus*, sehingga diperoleh data ukuran liposom yang lebih pasti dan dapat dilakukan analisis yang lebih sensitif. Selain itu, juga perlu dilakukan pengamatan dalam jangka waktu yang lebih panjang (lebih dari 84 hari) untuk liposom kontrol dan sonikasi untuk mengetahui batas waktu kestabilan pada penyimpanan suhu 4°C. Selain itu penelitian lain untuk menguji stabilitas EPC-TEL2,5 dari aspek biologi dan kimia juga diperlukan.

DAFTAR REFERENSI

1. Handschumacher RE. Drug used for immunosuppression: immunosuppressive agent. In: Goodman and Gilman (eds.). The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed.(II). Maxwell Macmillan Int. Edition 1991: 1264-76.
2. Calabresi, Chabner BA. Antineoplastic agents. In: Goodman and Gilman (eds.). The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed.(II). Maxwell Macmillan Int. Edition 1991: 1209-63.
3. Haynes Jr. RC. Adrenocorticotrophic hormone, adrenocortical steroids and their synthetic analogs; Inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: Goodman and Gilman (eds.). The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed.(II). Maxwell Macmillan Int. Edition 1991: 1431-62.
4. Mishina EV, Jusko WJ. Selected tissue distribution of liposomal methylprednisolone in rats. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1994 ;84: 47-52.
5. Mishina EV, Straubinger RM, Pszczynski NA, Jusko WJ. Enhancement of tissue delivery and receptor occupancy of methylprednisolone in rats by a liposomal formulation. J Pharmac Res 1993;10(10): 1402-9.
6. Freise CE, Liu T, Hong K, et al. The increase efficacy and decreased nephrotoxicity of cyclosporine liposome. Transplantation 1994;579(6): 928-32.
7. 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.
8. New RRC. Introduction. In: Liposomes. A Practical Approach. IRL Press 1990: 1-31.
9. Lasic DD(ed). Chemistry of lipids and liposomes. In: Liposomes from Physics to Application. Elsevier Science Publisher BV 1993: 1-42.

10. New RRC Introduction. In: New RRC (ed) Liposome. A Practical Approach. IRL Press 1990: 1-31.
11. Lasic DD. Liposomes as immuno-adjuvants. In: *Liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993: 347-64.
12. Ringoringo VS. Sistem Penyampaian Obat Terkontrol no.32. Pusat Penelitian dan Perkembangan PT Kalbe Farma, 1984.
13. 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 lipid from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Lipid*. 1995; 30(4):339-44.
14. New RRC. Preparation of liposomes. In: New RRC(ed.). *Liposomes. A Practical approach*. IRL Press 1991: 33-104.
15. Lasic DD(ed.). Preparation of liposomes. In: *Liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993: 63-107.
16. Ernie HP, Freisleben HJ, Sadikin M. Peningkatan Inkorporasi metilprednisolon palmitat pada liposom yang mengandung tetraeter lipid dari membran *Sulfolobus acidocaldarius* membentuk sediaan baru liposomal metilprednisolon palmitat. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2002; 1(1): 24-30.
17. Effendi AR. Efek Liposom metilprednisolon palmitat terhadap kadar TNF dan distribusinya di hepar dan limpa mencit. Tesis Program Studi Ilmu Biomedik FKUI, Program pascasarjana UI, November 2002.
18. Wawaimuli Arozal, FD Suyatna, Ernie HP, Hedi RD. Peningkatan Efek Antiinflamasi Sediaan Metilprednisolon dalam bentuk Liposom. *MKI* 2005; 56 (1): 17-22.
19. Nina Marlina. Efek Liposom Metilprednisolon Palmitat terhadap Proliferasi Limfosit CD4+ dan CD8+ yang distimulasi oleh Concavalin A secara in vitro. Tesis Program Studi Ilmu Biomedik FKUI, Program Pascasarjana UI, Januari 2004.

20. Lasic DD.(ed). Liposomes as adalah drug delivery system. In: Liposomes from Physics to Application. Elsevier Science Publisher BV 1993: 265-324.
21. Bangham AD. Liposome the Babraham connection. Chem Phys Lipids 1993; 64: 275-85.
22. Lasic DD. Liposomes. Science and Medicine 1996 (May-June): 34-43.
23. Anonym. Liposomes. Diunduh dari www.dadairs.com/liposomes.htm [26 Juli 2008].
24. Lasic DD (ed.). Chemistry of lipids and liposomes. In: Liposomes from Physics to Applicatin. Elsevier Science Publicher V 1993: 1-42.
25. Stern J, Freisleben HJ, Janku S, Ring K. Black lipid membranes of tetraether lipids from *Thermoplasma acidophilum*. Biochim Biophys Acta 1992;1128: 227-36.
26. Freisleben HJ, Henkel L, Gutermann R, Rudolph P, John G, Sternberg G, 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.
27. Anonim. Scheme of liposome. Februari 2008. Diunduh dari:http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Liposome_scheme-en.svg.
7 Desember 2008.
28. Gregoriadis G. Liposome technology: preparation of liposome. Vol 1. Florida: CRC Press; 2000. p. 11-5.
29. Mahato RI, Rolland A, Tomlinson E. Cationic lipid based gene delivery system: pharmaceutical perspectives. Pharm Res 1997;14: 853-9.
30. Jufri M. Arah perkembangan liposome drugs delivery system. Majalah Ilmu Kefarmasian 2004; I(2): 59-68.
31. Allen TM, Hansen C, Martin F, Rademann C, Yauyong A. Liposomes

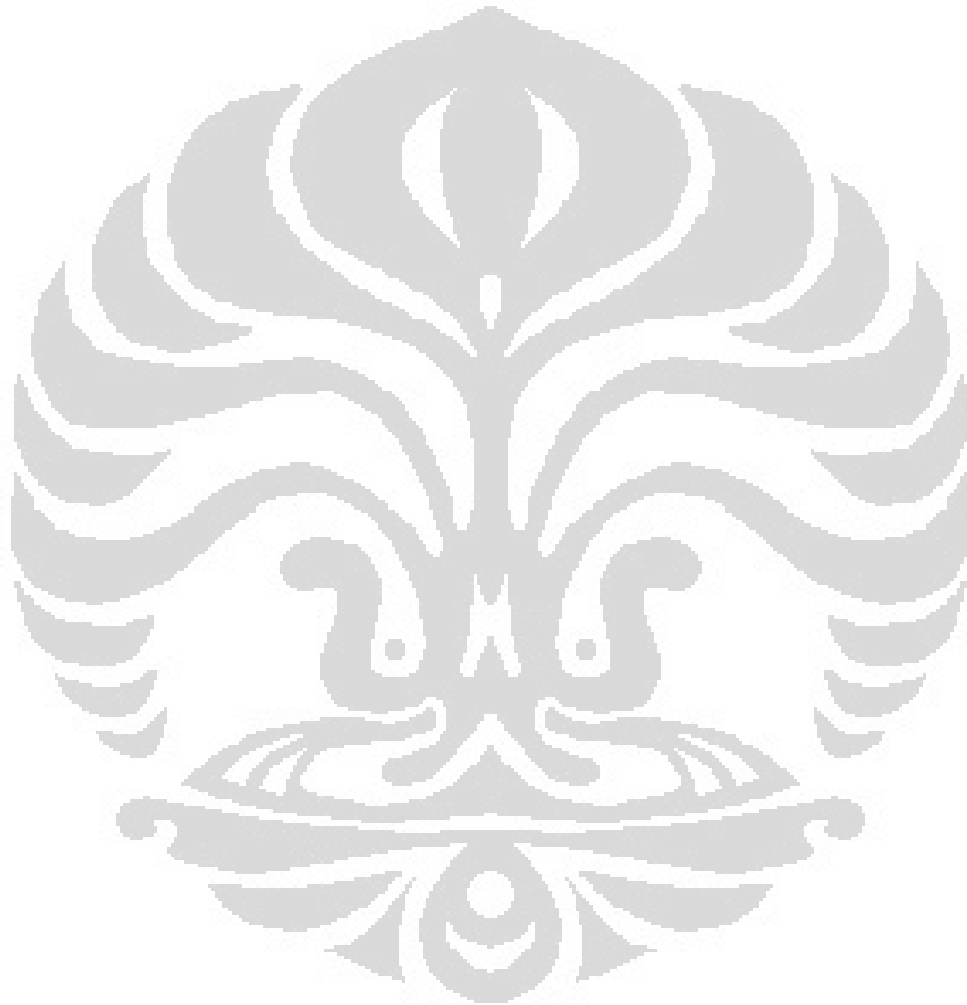
containing synthetic lipid derivatives of polyethylene glycol showed prolonged circulation half lives in vivo. *Biochem Biophys Acta* 1991;1066: 29-36.

32. Lassic DD. Novel application of liposomes. *Trend Biotechnol* 1998;16: 307-27.
33. Mahato RI, Rolland A, Tomlinson E. Cationic lipid based gene delivery system: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res* 1997;14: 853-9.
34. Freisleben HJ, Neisser C, Hartmann M, Rudolph P, Geck P, Ring K, Muller WEG. Influence of the main phospholipid (MPL) from *Thermoplasma acidophilum* and of liposomes from MPL on living cells: cytotoxicity and mutagenicity. *J Liposome Research* 1993; 3(3): 817-33.
35. 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 Research* 1995; 5(1): 215-23.
36. Freisleben HJ, Antonopoulos E, Balakirev M, Balakirev L, Hartmann K, et al. Tetraether lipid derivatives and liposomes and lipid agglomerates containing tetraether lipid derivatives, and use there Of. 2001. Diunduh dari <http://www.freepatentsonline.com/6316260.html> [4 Desember 2006].
37. Freisleben HJ. The main phospholipid of the Archaea *Thermoplasma acidophilum*. Does the liposome technology with this unique tetraether lipid provide novel perspectives for biochemistry and medicine? Habilitation at Johann-Wolfgang, Goethe-University, Frankfurt am Main, 1992
38. Purwaningsih EH. Inkorporasi metilprednisolon ke dalam membran liposom: kegagalan preparasi dengan metode pengocokan dan ekstrusi. *Majalah Kedokteran FK-UKI* 2004; 61.
39. Patel GB, Agnew BJ, Deschatelets L, Fleming LP, Sprott GD. In vitro assessment of archaeosome stability for developing oral delivery systems.

Int J Pharmac 2000; 194: 39-49.

40. Lasic DD (ed). Preparation of Liposomes. In: Liposomes from Physics to Application. Elsevier Science Publisher BV 1993: 63-107.

41. New RRC. Characterization of Liposomes. J Pharmac Sci 1986; 75(4):330-3.



Lampiran *Curriculum Vitae*

1. Nama Lengkap : DWI NOTOSUSANTO
2. Nama Panggilan : DWI
3. Tempat dan Tanggal lahir : Jakarta, 9 Februari 1986
4. Jenis Kelamin : Laki-laki
5. Hobi : Menulis artikel, blogs, bahasa Jepang
6. Alamat : Jl. H. Muchtar 3 No.50A RT 003 RW 10
Kreo, Larangan Banten 15156
7. Hp : 081315920053
8. Alamat email : denotosvanto@gmail.com
9. Riwayat Pendidikan :
 - SDN Kreo 4, Banten (1992-1998)
 - SLTPN 110 Petukangan (1998-2001)
 - SMUN 70 Jakarta (2001-2004)
 - Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (2005-sekarang)
10. Keterlibatan dalam Organisasi:
 - PJ Pengwas Internal IT-SMIKMFKUI tahun 2007-2008
 - Anggota Mentari Forum Studi Islam (FSI) SM-IKMFKUI 2009
 - Anggota seminar Taekwondo SM-IKMFKUI
 - *Supporter Green Peace* Indonesia
 - Anggota tim Duta Hijau Universitas Indonesia
 - Anggota *Dermatovenereology Interest Club (DIC)*
11. Prestasi:
 - Pengajar Bimbingan Tes Alumni cabang Ciledug sejak 2007
 - *Freelancer of Healthcare Translator* Indonesian NEC March 2009
 - Narasumber seminar "Menguak Mozaik Keragaman Sexualö, FISIP UI pada Mei 2008
 - Juara I *Research Paper Competition* Liga Medika Sains 2008, dengan judul penelitian: *The Correlation Between Watching Television and The Function of Retina in Children*