PERBANDINGAN UJI STABILITAS LIPOSOM EPC-TEL 2,5 HASIL SONIKASI DALAM LARUTAN NaCl DAN $CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7

OLEH :

YENNY RACHMAWATI, 010500188X

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

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS INDONESIA JAKARTA

2008

LEMBAR PERSETUJUAN

PERBANDINGAN UJI STABILITAS LIPOSOM EPC-TEL 2,5 HASIL SONIKASI DALAM LARUTAN NaCL DAN $CaCL_2$ 150 mOsmol pH 7

YENNY RACHMAWATI
010500188X

PEMBIMBING : Drs. Yulhasri MS.
NIK. 132 127 782

MENGETAHUI

KETUA MODUL RISET 2007-2008

Prof. Dr. dr. Erni H Purwaningsih
NIK. 130 810 259

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan kesehatan jasmani dan rohani, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul "PERBANDINGAN UJI STABILITAS LIPOSOM (EPC-TEL 2,5) HASIL SONIKASI DALAM LARUTAN NaCL DAN $CaCL_2$ 150 mOsmol pH 7", dengan baik.

Penulis sangat berterima kasih kepada Prof. DR. Dr. Erni Purwaningsih selaku ketua modul riset FKUI, sekaligus penanggung jawab penelitian ini, yang telah dengan sabar meluangkan waktu untuk membimbing saya sejak penulisan usulan penelitian hingga selesainya penelitian ini. Tanpa bimbingannya, maka penulisan ini tidak akan pernah terwujud.

Terima kasih saya ucapkan kepada Drs. Yulhasri MS. selaku pembimbing, yang telah membimbing dan membantu saya menyempurnakan penulisan laporan penelitian ini. Terima kasih kepada dr. Saptawati Bandosono MSc. yang telah membantu dan mengajarkan saya mengenai statistik dan SPSS sehingga saya dapat melakukan analisis dengan baik. Juga kepada dr. Wawaimuli Arozal dari Departemen Farmakologi FKUI yang telah membantu dalam penyediaan dan penggunaan alat sonikator, sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

Terima kasih pula kepada staf dari Departemen Biokimia FKUI dan Fisika FKUI yang telah membantu kelancaran penelitian ini. Tidak lupa saya ucapkan terima kasih kepada karyawan di Departemen Farmasi, yang telah banyak membantu saya selama pelaksanaan penelitian ini.

Pada kesempatan ini, saya mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada ibu saya, Mulyati Spd., yang selalu tegar membimbing dan memberikan doa restu, walaupun tanpa dampingan ayah saya, Abdullah HM., yang telah tiada. Terima kasih juga saya ucapkan kepada kakak dan adik saya, Diana, Ichsan, dan Idris yang selalu memberikan semangat kepada saya untuk maju. Juga kepada Drs. Amos Kandola, MPd. MM. yang selalu mendukung dan membimbing saya selama ini. Dan juga kepada seluruh keluarga besar yang selalu memberikan dukungan dan semangat.

Tidak mungkin saya lupakan, ucapan terima kasih kepada angkatan 2005 FKUI yang selalu "PRIMA" menjalani kehidupan di fakultas kedokteran Universitas Indonesia. Terutama sahabat-sahabat saya, Nelfidayani, Nina Asrini Noor, Venessa, dan Widya Safitri yang selalu bersama dan saling membantu selama saya menuntut ilmu di FKUI. Tidak lupa saya ucapkan terima kasih kepada teman-teman seperjuangan, kelompok riset liposom, yang telah membantu, bertukar pikiran, dalam melaksanakan penelitian ini.

Saya sadar bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, saya sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun terhadap penulisan ini, agar dapat menjadi lebih baik.

Jakarta, Mei 2008

DAFTAR ISI

Ucapan Terima Kasih i

Daftar Isi iii

Daftar Gambar v

Daftar Tabel vi

Daftar Singkatan vii

Abstrak viii

Abstract ix

BAB I PENDAHULUAN 1

1.1 Latar Belakang 1

1.2 Rumusan Masalah 2

1.3 Tujuan Penelitian 3

1.4 Hipotesis Penelitian 3

1.5 Manfaat 3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA 5

2.1 Liposom 5

2.1.1 Komponen Penyusun Liposom 5

2.1.2 Struktur dan Pembentukan Liposom 6

2.1.3 Aplikasi Liposom 7

2.2 Tetraeter Lipid 10

2.3 Garam Fisiologis 12

2.3.1 Natrium Klorida (NaCl) 12

2.3.2 Kalsium Klorida ($CaCl_2$) 13

2.4 Kerangka Konsep 15

BAB III METODE PENELITIAN 16

3.1 Desain Penelitian 16

3.2 Bahan dan Alat 17

3.2.1 Bahan 17

3.2.2 Alat 17
3.3 Cara Kerja 17
3.3.1 Preparasi Liposom 17
3.3.2 Pengukuran dan perhitungan 19

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 20

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 25
5.1 Kesimpulan 25
5.2 Saran 25

DAFTAR PUSTAKA 26

LAMPIRAN 30
1. Perhitungan EPC, TEL, NaCl, $CaCl_2$, dan Quinakrin 30
2. Besar sampel 32
3. Hasil analisis statistik Kruskal Wallis 33
4. Hasil foto liposom 34

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

1. Vesikel dwilapis lipid 5
2. Foto liposom menggunakan mikroskop elektron 7
3. Gambaran interaksi antara obat dengan liposom secara skematik..... 8
4. TEL *Thermoplasma acidophilum* 11
5. Membran liposom dari TEL yang terdiri dari satu lapis lipid..... 11
6. Struktur NaCl 12
7. Hasil foto contoh 20
8. Grafik data jumlah liposom 22
9. Gambaran skematik inkorporasi TEL dalam membran dwilapis lipid dari EPC 23

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

1. Hasil pengukuran liposom 21

DAFTAR SINGKATAN

$CaCl_2$	Calcium Cloride
DNA	deoxyribonucleic acid
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
ECF	Extracellular fluid
EPC	Egg-yolk Phosphatidyl Choline
ICF	Intracellular fluid
LMV	Large multilamellar vesicles
LUV	Large unilamellar vesicles
NaCl	Natrium Cloride
nm	nanometer
NO	Nitric Oxide
µm	micrometer
mOsmol	miliosmolaritas
MVV	Multivesicular vesicles
RES	Reticuloendoplasmic systems
Scl	side-chain lipid
SPC	Soy-bean Phosphatidyl Choline
SUV	Small unilamellar vesicles
TEL	Tetra ether lipid

ABSTRAK

Sebagai pembawa obat yang langsung bekerja pada sel target, liposom terbukti meningkatkan efektivitas obat dan mengurangi efek samping sistemik, terutama untuk terapi jangka panjang. Liposom yang saat ini sedang dikembangkan, merupakan kombinasi fosfatidil kolin kuning telur (*Egg yolk Phosphatidil Choline* / EPC) dan Tetraeter Lipid 2,5 mol % dari *Thermoplasma acidophilum* yang kemudian dinamakan sebagai liposom EPC-TEL 2,5. Penelitian ini bertujuan untuk menguji kestabilan liposom EPC TEL 2,5 hasil sonikasi selama 60 menit, dalam larutan garam yang lazim digunakan sebagai larutan elektrolit, NaCl dan $CaCl_2$ pH 7, dengan penyimpanan pada suhu 4^oC dan pengamatan pada hari ke-0, 7, 30, 60, dan 90. Parameter kestabilan yang diukur adalah tidak bertambahnya diameter liposom dan jumlah liposom yang berukuran lebih dari 100 nm. Hasil dan Kesimpulan: Tidak terjadi peningkatan jumlah liposom yang berukuran lebih dari 100 nm secara bermakna pada liposom yang terpapar NaCl 150 mOsmol pH 7 maupun $CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7.

Kata kunci : NaCl, $CaCl_2$, EPC TEL 2,5, Thermoplasma acidophilum,Liposom .

ABSTRACT

Comparative Stability Test of Liposome Tetraether Lipid (EPC-TEL 2,5) After Sonication in NaCl 150 mOsmol pH 7 and CaCl2 150 mOsmol pH 7 Solutions. As a drug carrier which is directly act on targeted cell, liposome has proved to increase drug efficacy and reduce systemic side effect of drugs, especially for long term therapy. Liposome, which has still developed, is the combination of Egg yolk Phosphatidyl Choline (EPC) and Tetraether Lipid 2,5 mol % isolated from the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*, which is called EPC-TEL 2,5. The aim of this study is to prove the chemical stability of liposome EPC-TEL 2,5 with the addition of selected salts which are commonly used as electrolyte solution (NaCl pH 7 dan $CaCl_2$ pH 7 150 mOsmol), after 60 minutes sonication and storage in 4^{o}C, after observation at day 0, 7, 30, 60, 90. The stability parameters in this study are that diameter of liposome and the amount of liposome larger than 100 nm. There was no significant different between the amount of liposome which have sizes greater than 100 nm in addition of NaCl 150 mOsmol pH 7 or $CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7.

Keywords : *NaCl, $CaCl_2$, EPC TEL 2,5, Thermoplasma acidophilum,Liposome* .

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Masih banyak kasus yang membutuhkan pengobatan jangka panjang dengan dosis obat yang tinggi. Hal tersebut, tentu saja menimbulkan berbagai masalah terapi, antara lain tingginya dosis terapi yang berakibat meningkatnya efek samping, pemberian obat secara sistemik berpengaruh pada semua organ termasuk organ bukan sasaran, terutama organ yang sensitif sehingga timbul reaksi obat yang tidak diinginkan, dan juga kepatuhan penderita akibat tingginya frekuensi pemberian obat atau cara pemberian obat yang kurang nyaman[1-3].

Salah satu cara untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan aplikasi pembawa obat. Pembawa obat adalah sediaan yang dibuat agar obat dapat langsung atau dengan mudah mencapai organ atau sel sasaran. Berbagai jenis dan bentuk pembawa obat dikembangkan dengan mempertimbangkan beberapa faktor yaitu: struktur; sifat fisik dan kimia obat; bentuk dan letak reseptor obat pada sel; mekanisme interaksi antara obat dan pembawa obat, serta pembawa obat dan sel sasaran. Pembawa obat yang baik harus bersifat biokompatibel, mudah didegradasi, tidak toksik, tidak mutagenik, dan tidak bersifat immunogenik[4-5].

Obat dapat bersifat hidrofil, lipofil, asam, atau basa[6]. Interaksi obat dengan pembawa obat dipengaruhi oleh sifat obat tersebut. Obat yang bersifat non-polar, yang mempunyai reseptor pada membran sel, mudah berikatan dengan pembawa obat berupa lipid. Obat polar, yang umumnya sulit melalui membran, dapat berikatan dengan pembawa obat misalnya peptida[7-8].

Sampai saat ini, salah satu pembawa obat yang masih dikembangkan adalah liposom. Dengan liposom dosis obat yang diperlukan untuk mencapai dosis terapi bisa diturunkan dan diharapkan dapat mengurangi risiko timbulnya efek samping obat. Aplikasi obat dalam pembawa obat terbukti meningkatkan efek terapi serta menurunkan efek samping obat. Efek terapi

obat dinilai berdasarkan beberapa parameter, seperti dosis yang lebih rendah, frekuensi pemberian berkurang, efek yang lebih baik[9-15].

Liposom dengan formulasi baru yang saat ini sedang dikembangkan menggunakan kombinasi fosfatidil kolin kuning telur (*Egg yolk Phosphatidyl Choline* / EPC) dengan Tetraeter Lipid dari *Thermoplasma acidophilum* dengan kadar rendah, yaitu 2,5 mol %, yang kemudian disebut liposom EPC-TEL 2,5[16]. Liposom ini telah terbukti dapat mengikat obat metilprednisolon palmitat lebih baik, yang menunjukkan efek terapi imunologik, dan terdistribusi dengan baik dalam organ, yang berbeda bermakna dibandingkan dengan kontrol yaitu metilprednisolon tanpa liposom[16-17].

Akan tetapi liposom EPC-TEL 2,5 masih perlu diuji kestabilannya secara kimia. Kestabilan liposom secara kimia melibatkan pemaparan garam-garam fisiologis yang merupakan komponen elektrolit utama dalam tubuh manusia, antara lain Na^+, Ca^{2+}, dan Cl^- [18]. Garam tersebut juga merupakan garam-garam fisiologis yang biasa digunakan sebagai cairan infus[19].

Dalam penelitian ini, akan diuji stabilitas liposom EPC-TEL 2,5 secara kimiawi. Penelitian ini mencakup liposom hasil sonikasi, dan diberi perlakuan berupa pemaparan garam-garam fisiologis (NaCl, $CaCl_2$) pada pH netral dengan masa penyimpanan 90 hari dan observasi pada hari-0, 7, 30, 60, dan 90.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah di atas, dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

1. Apakah liposom EPC-TEL 2,5 terbukti stabil secara kimiawi dengan pemaparan garam NaCl 150 mOsmol pada pH 7 hingga penyimpanan hari-90?
2. Apakah liposom EPC-TEL 2,5 terbukti stabil secara kimiawi dengan pemaparan garam $CaCl_2$ 150 mOsmol pada pH 7 hingga penyimpanan hari-90?

3. Apakah terdapat perbedaan kestabilan antara liposom dengan paparan NaCl dibandingkan dengan liposom dengan paparan $CaCl_2$ 150 mOsmol pada pH 7 hingga penyimpanan hari-90?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan :

1. Menguji stabilitas liposom EPC-TEL 2,5 secara kimiawi dengan cara mengukur ukuran dari partikel liposom berlabel fluoresens (*in vitro*) setelah liposom terpapar dengan garam NaCl, $CaCl_2$ pada pH 7, selama waktu penyimpanan 90 hari.
2. Membandingkan kestabilan antara liposom yang terpapar NaCl dengan liposom yang terpapar $CaCl_2$ 150 mOsmol pada pH 7, selama waktu penyimpanan 90 hari.

1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah :

1. Liposom EPC-TEL 2,5 tidak berbeda bermakna secara in vitro pada uji stabilitas kimia dengan paparan garam NaCl dan $CaCl_2$ 150 mOsmol pada pH 7 dengan masa penyimpanan 90 hari.
2. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kestabilan liposom dengan paparan NaCl dibandingkan dengan liposom dengan paparan $CaCl_2$ 150 mOsmol pada pH 7 hingga penyimpanan hari-90.

1.5 Manfaat

1. Apabila liposom EPC-TEL 2,5 terbukti lebih stabil secara kimia, maka formulasi liposom yang baru ini dapat dimanfaatkan untuk menginkorporasikan obat. Obat yang diinkorporasikan adalah obat untuk terapi jangka panjang, sehingga lebih efektif karena dosis obat lebih rendah dengan efek samping obat dapat ditekan serendah mungkin.

2. Keberhasilan dalam formulasi pembawa obat yang baru ini akan bermanfaat dalam perkembangan dalam bidang nanoteknologi untuk terapi jangka panjang, terutama bagi industri farmasi.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Liposom

2.1.1 Komponen Penyusun Liposom

Liposom adalah vesikel sederhana dimana inti air seluruhnya diselubungi oleh membran yang terdiri dari molekul lipid. Umumnya liposom terdiri atas fosfatidil kolin dan dapat juga mengandung fosfatidiletanolamin, fosatidilserin, sfingomielin, kolesterol dan lipid lain dengan atau tanpa bahan lain sebagai stabilisator membran. Struktur dan komposisi liposom menyerupai membran biologis yang berupa dwilapis lipid. Sifatnya yang menyerupai membran biologis membuat liposom dapat didegradasi dengan jalur yang sama dengan membran sel, membuat liposom sangat aman dan menjadi pembawa obat yang efektif untuk aplikasi medis[20-21]. Struktur liposom digambarkan secara skematis pada Gambar 1.

Gambar 1. Vesikel dwilapis lipid[20]

Liposom dibentuk dengan cara mendispersikan suatu lipid, terutama fosfolipid, ke dalam media cair. Struktur dan kegunaan liposom pertama kali ditemukan oleh Alec Bangham dari Cambridge pada awal tahun 1960, dan sejak saat itu liposom menjadi alat yang multifungsional dalam bidang biologi, biokimia, dan kedokteran[20,22].

Komponen utama yang digunakan untuk membentuk liposom adalah fosfolipid, karena lipid jenis ini dapat membentuk lapis ganda yang menyerupai lapis lipid ganda pada membran biologis[20,22-24]. Fosfolipid merupakan komponen struktural membran biologis, terutama terdiri atas fosfatidilkolin, fosfatidilserin, dan fosfatidilinositol. Lipid yang bersifat netral adalah fosfatidiletanolamin, dan lipid yang bermuatan negatif adalah fosfolipid asam misalnya dipalmitoil-fosfatidilgliserol (DPPG) dan dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC)[20-22,25].

Fosfolipid yang lazim digunakan pada pembuatan liposom konvesional adalah fosfatidilkolin, yang disebut juga lesitin. Fosfatidilkolin adalah molekul amfifatik dimana jembatan gliserol menghubungkan sepasang rantai asil hidrokarbon hidrofobik, dengan kepala polar hidrofilik, fosfokolin. Fosfatidilkolin (lesitin) bisa dibentuk baik dari sumber natural maupun sintetik. Fosfatidilkolin alami dapat diambil dari kuning telur (*Egg-yolk Phosphatidyl Choline* = EPC), kedelai (*Soy-bean Phosphatidyl Choline* = SPC), dan yang lebih jarang dari jantung sapi dan korda spinalis[20-21].

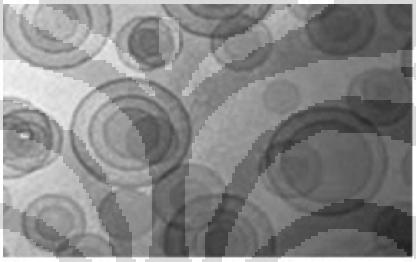
Lipid bermuatan seperti fosfatidilserin atau fosfatidilgliserol sering ditambahkan sebagai stabilisator. Kolesterol dapat ditambahkan untuk memperbaiki stabilitas mekanis dan untuk menurunkan kebocoran senyawa aktif melalui membran. Lipid lain yang dapat digunakan sebagai stabilisator membran liposom, yang saat ini masih dikembangkan adalah tetraeter lipid (TEL) dari membran Archaea, antara lain *Thermoplasma acidophilum* dan *Sulfolobus acidocaldarius*. Jenis lipid tersebut dapat pula dihasilkan dari polimerasi senyawa yang mudah berpolimerasi, antara lain 1,3 butadin, butadiene dan metakrilat[21,26-27].

2.1.2 Struktur dan Pembentukan Liposom

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 dengan 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 hinga 100 μm dengan ketebalan membran liposom (lapis ganda fosfolipid) berkisar antara 4-6 nm[5].

Liposom dapat diproduksi dalam bentuk vesikel lemak unilaminar atau multilaminar yang menyelubungi ruangan inti yang berisi air[24]. Pada Gambar 2 dapat dilihat, berdasarkan jumlah lapisan membrannya, liposom dapat dibagi menjadi : *small unilamellar vesicles* (SUV), *large unilamellar vesicles* (LUV), *large multilamellar vesicles* (LMV), dan *multivesicular vesicles* (MVV). SUV memiliki diameter mulai dari 20 hingga kurang lebih 100 nm. LUV, LMV, dan MVV memiliki ukuran dengan kisaran ratusan nanometer hingga beberapa mikron[23].



Gambar 2. Foto liposom menggunakan mikroskop elektron[23]

Jumlah lapisan membran dan besar ukuran liposom ditentukan oleh cara pembuatannya. Liposom atau vesikel, yang dibuat dengan cara *hand-shaken* akan berbentuk multilamelar dan berukuran besar (LMV) sekitar 7500 nm. Ukuran liposom tersebut dapat diperkecil menjadi SUV dengan cara mengekstrusinya melalui membran polikarbonat 100 nm atau dengan cara sonikasi menggunakan *probe* atau sonikasi di dalam air. Sonifikasi terhadap LUV juga akan menghasilkan SUV. [25,28].

2.1.3 Aplikasi Liposom

Liposom yang digunakan sebagai pembawa obat, dapat membawa substansi hidrofilik dalam inti airnya. Vesikel ini dapat digunakan sebagai pembawa obat dan diisi dengan berbagai jenis molekul seperti molekul obat

kecil, protein, nukleotida dan bahkan plasmid. 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[4,29]. Ikatan liposom dengan molekul obat, ditunjukkan secara skematis pada Gambar 3.

Gambar 3. Gambaran interaksi antara obat dengan liposom secara skematik[4]

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).

Liposom dapat mengeluarkan isinya dengan berbagai cara. Yang pertama, liposom melepaskan isinya melalui penyatuan sempurna lipid pada liposom dengan membran sel. Melalui cara ini, isi liposom akan terpapar langsung dengan sitoplasma sel dan tetap diselubungi membran biologis. Yang kedua, isi liposom dilepaskan ke ruang interstisial. Dengan demikian, transpor paraseluler substansi aktif dalam liposom dapat belangsung pada usus halus melalui dinding usus[24].

Untuk bahan obat yang bersifat lipofilik, bentuk liposom multilamelar merupakan pilihan utama, karena jumlah obat yang akan dibawa, yang terikat pada membran, akan lebih banyak. Untuk bahan yang bersifat hidrofilik, besarnya vesikel liposom, yang umumnya hanya terdiri atas satu lapis membran, menentukan jumlah obat yang akan dibawa[4,20].

Liposom memberikan beberapa kuntungan sebagai pembawa obat, antara lain:

- Liposom dapat membawa obat pada target tertentu. Misalnya, *long-circulating liposomes* merupakan liposom dengan target selektif pada area patologis tertentu dalam tubuh.
- Liposom dapat meningkatkan efektivitas obat dengan melepaskannya secara perlahan-lahan[30]. Dengan demikian, memperpanjang waktu paruh obat sehingga dosis dan frekuensi pemberian obat dapat diturunkan yang secara tidak langsung menurunkan efek samping obat terhadap tubuh pasien.
- Liposom dapat melindungi obat dari degradasi metabolik oleh enzim metabolisme.
- Liposom melindungi pasien dari efek samping obat karena komponen tubuh tidak langsung terpapar oleh dosis penuh dari obat yang digunakan.
- Liposom dapat melarutkan obat lipofilik yang sulit diberikan secara intravena. Dengan melarutkannya dalam liposom, obat lipofilik tersebut menjadi lebih mudah diberikan[31].
- Liposom mudah dibuat dan lebih murah dibandingkan dengan zat pembawa obat lainnya.

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, pH, osmolaritas, konduktivitas, adanya kemungkinan produk hasil degradasi, endotoksin dan parameter-parameter lainnya[5].

Persyaratan untuk penggunaan liposom sebagai pembawa obat adalah stabilitas, baik fisik, kimia, maupun biologi dan jumlah lapisan membran lipid per liposom[21,32]. Liposom yang stabil secara fisik, kimia, dan biologi akan dapat membawa obat dengan lebih baik hingga mencapai target dan tujuannya.

Karakeristik liposom, seperti kekuatan dan kestabilan, sangat ditentukan oleh komponen penyusunnya. Sebagai contoh, fosfolipid jenuh seperti *dipalmitoylphosphatidylcholine* membentuk struktur lipid yang kokoh tetapi impermeabel. Sebaliknya, fosfolipid tak jenuh seperti *phosphatidylcholine* yang

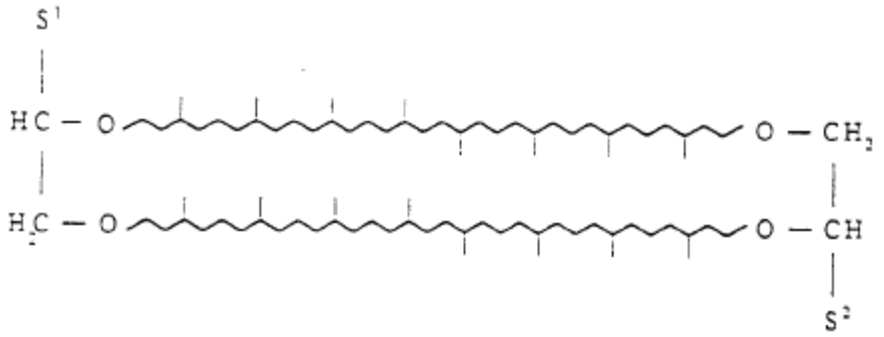
berasal dari sumber alami (telur atau kacang kedelai) membentuk struktur yang permeabel tetapi kurang stabil[33]. Liposom yang pertama kali dikembangkan belum bersifat menguntungkan karena stabilitasnya masih rendah dan waktu paruhnya yang singkat meskipun disimpan dalam fase pendingin[24].

Stabilitas penyimpanan liposom dapat ditingkatkan dengan penambahan asam fosfatidat, tetapi peningkatan stabilitas yang diperoleh masih belum cukup untuk memenuhi berbagai tujuan. Di samping itu, salah satu tipe liposom (*conventional liposome*) bersifat tidak stabil dalam asam dan tidak dapat bertahan dalam proses pencernaan pada usus kecil. Akibatnya, liposom ini tidak cocok untuk transpor substansi farmatik aktif yang setelah pemberian oral akan melalui proses pencernaan dalam lambung dan usus kecil.

Berbagai percobaan dan penelitian terus dilakukan untuk mendapatkan komposisi liposom yang tepat untuk membentuk liposom yang stabil secara fisik, kimia dan biologis sehingga dapat digunakan dengan mudah dan aman. Selain itu, komposisi liposom tersebut hendaknya dapat membentuk berbagai variasi liposom sesuai dengan tujuan dan fungsi yang dikehendaki. Salah satu jenis substansi yang menjanjikan adalah derivat tetraeter lipid, seperti yang dapat diperoleh dari sumber alami. Liposom yang dibentuk dari kombinasi demikian menunjukkan perbaikan dan dapat menutupi kekurangan liposom konvensional. Walaupun demikian, tidak seluruh turunan tetraeter lipid yang telah ditemukan sesuai untuk membentuk liposom[24].

2.2 Tetra Eter lipid

Tetra eter lipid (TEL) merupakan salah satu hasil ekstrasi dari Archaea yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum*[26-27] dan *Sulfolobus acidocaldarius*. TEL yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum* telah teruji tidak toksik dan tidak bersifat mutagenik dan antimutagenik, secara *in vitro* dan *in vivo*[34-35], sedangkan pada *Sulfolobus acidocaldarius* belum teruji. Struktur TEL dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. TEL *Thermoplasma acidophilum*[37]

Fosfolipid yang diekstrasi dari membran *Thermoplasma acidophilum* atau *Sulfolobus acidocaldarius* berupa eter-gliserol atau derivat poliol lain (nonitol dari membran *Sulfolobus acidocaldarius*) yang membentuk lapisan lipid monolayer, berbeda bila dibandingkan dengan fosfolipid pada membran sel lain berupa ester-gliserol yang membentuk lapisan bilayer. Struktur monolayer TEL dapat dilihat pada Gambar 5. Ikatan eter-gliserol sangat resisten terhadap hidrolisis pada pH rendah sehingga memberi keuntungan dibandingkan dengan ikatan ester. Ketiadaan ikatan rangkap (monolayer) dalam struktur TEL meningkatkan resistensi terhadap oksidasi, sedangkan adanya gugus metil samping akan menambah efek fluiditas. Jadi, TEL bersifat stabil dengan ikatan yang cukup erat[4,26-27,36].

Gambar 5. Membran liposom dari TEL yang terdiri dari satu lapis lipid[4]

Thermoplasma acidophilum adalah archaebakterium termoasidofilik yang pertama kali diisolasi oleh Darland dkk., pada tahun 1970. *Thermoplasma* tumbuh pada lingkungan dengan pH antara 1-4 dan pada temperatur 33^{o}C hingga 67^{o}C[37]. Penelitian oleh Patel dan kawan-kawan pada archaesome, yaitu liposom yang terbuat dari membran Archae lain yaitu *Methanosarcina mazei, Methanobacterium espanolae,* dan *Thermoplasma acidophilum* menunjukkan

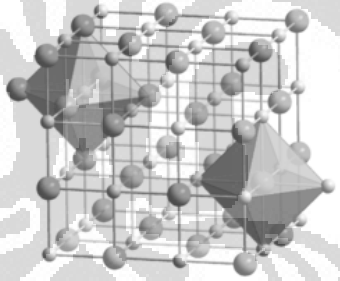
bahwa vesikel multilamelar (MLV) dari *T.acidophilum, in vitro*, paling stabil di antara ketiga jenis Archae tersebut[38].

2.3 Garam Fisiologis

2.3.1 Natrium Klorida (NaCl)

Natrium klorida mempunyai formula NaCl, dan merupakan garam yang penting dalam cairan ekstraselular pada banyak organisme multiseluler. Pada satu gram natrium klorida, terdapat sekitar 0,3933 gram natrium, dan 0,06067 gram klorin[39].

Natrium klorida berbentuk kristal dengan kubus simetris. Dalam struktur ini, ion klorida yang lebih besar, tersusun dalam kubus tertutup, sedangkan ion natrium yang lebih kecil, mengisi ruang oktahedral diantaranya. Setiap ion dikelilingi oleh 6 ion yang berlainan. Struktur ini disebut struktur halit. Ion-ion tersebut diikat oleh ikatan ionik dan tekanan elektrostatik[39]. Struktur NaCl dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur NaCl[40]

Di dalam molekul NaCl, natrium berada dalam bentuk ion sebagai Na^+. Diperkirakan hampir 100 gram dari ion natrium (Na^+) atau ekuivalen dengan 250 gr NaCl terkandung di dalam tubuh manusia. Garam natrium merupakan garam yang dapat secara cepat diserap oleh tubuh dengan minimum kebutuhan untuk orang dewasa berkisar antara 1,3-1,6 gr/hari (ekuivalen dengan 3,3-4,0 gr NaCl/hari)[18].

Setiap kelebihan natrium yang terjadi di dalam tubuh dapat dikeluarkan melalui urin & keringat. Hampir semua natrium yang terdapat di dalam tubuh akan tersimpan di dalam jaringan lunak tubuh dan cairan tubuh. Ion natrium

(Na^+) merupakan kation utama di dalam cairan ekstraselular (ECF) dengan konsentrasi berkisar antara 135-145 mmol/L. Ion natrium juga akan berada pada cairan intraselular (ICF) namun dengan konsentrasi yang lebih kecil yaitu ± 3 mmol/L[18].

Elektrolit utama yang berada di dalam cairan ekstraselular (ECF) adalah elektrolit bermuatan negatif yaitu klorida (Cl^-). Jumlah ion klorida (Cl^-) yang terdapat di dalam jaringan tubuh diperkirakan sebanyak 1.1 g/Kg berat badan dengan konsentrasi antara 98-106 mmol/L. Konsentrasi ion klorida tertinggi terdapat pada cairan serebrospinal, seperti otak atau sumsum tulang belakang, lambung dan juga pankreas. Sebagai anion utama dalam cairan ekstraselular, ion klorida juga akan berperan dalam menjaga keseimbangan cairan-elektrolit. Selain itu, ion klorida juga mempunyai fungsi fisiologis penting yaitu sebagai pengatur derajat keasaman lambung dan ikut berperan dalam menjaga keseimbangan asam-basa tubuh. Bersama dengan ion natrium (Na^+), ion klorida juga merupakan ion dengan konsentrasi terbesar yang keluar melalui keringat[18].

Pada manusia, asupan tinggi garam telah terbukti mengurangi produksi NO (*Nitric Oxide*). NO berperan dalam homeostasis pembuluh darah dengan menghambat kontraksi dan pertumbuhan otot polos pembuluh darah, agregasi trombosit, dan penempelan leukosit pada endotel[41]. Pada cairan intravena, NaCl merupakan elektrolit yang terkandung di dalamnya. Dan sering digunakan untuk rehidrasi pasien[19].

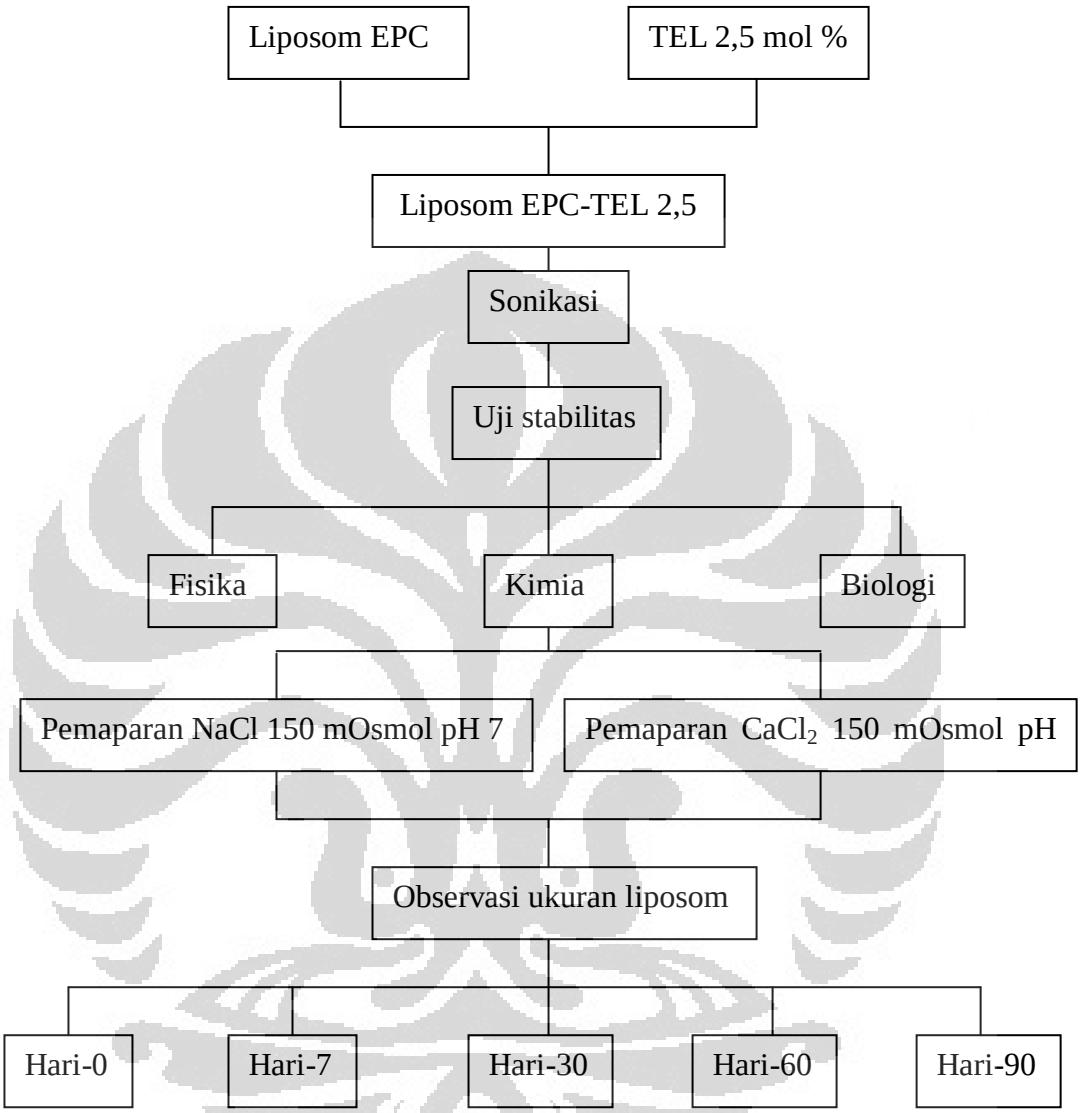
2.3.2 Kalsium Klorida ($CaCl_2$)

Kalsium klorida ($CaCl_2$), merupakan senyawa ionik dari kalsium dan klorin. Senyawa ini sangat larut dalam air. Merupakan garam berbentuk padat pada suhu ruangan[41]. Di dalam tubuh, kalsium (Ca^{2+}) bersama dengan kalium (K^+) dan natrium (Na^+), akan berperan dalam transmisi saraf, pengaturan enzim dan kontraksi otot[18].

Kalsium klorida bisa diinjeksikan sebagai terapi intravena untuk tatalaksana hipokalsemia. Juga bisa digunakan untuk : gigitan atau sengatan serangga (seperti gigitan *Black Widow Spider*); reaksi hipersensitivitas,

terutama jika bercirikan urtikaria; intoksikasi magnesium; pada resusitasi jantung, terutama setelah operasi bedah jantung terbuka. Kalsium parenteral bisa digunakan saat epinefrin gagal meningkatkan kontraksi miokardium yang lemah. Kalsium klorida bisa membantu menurunkan jumlah tinggi kalium serum pada hiperkalemi. Juga bisa digunakan untuk tatalaksana toksisitas *Calcium Channel Blocker*, dari efek samping obat seperti Dilziatem, membantu menghindari kemungkinan serangan jantung. Bentuk cair kalsium klorida digunakan dalam transformasi genetik oleh sel dengan meningkatkan permeabilitas membran, menginduksi kompetensi untuk ambilan DNA (memungkinkan fragmen DNA memasuki sel lebih cepat)[40].

2.4 Kerangka Konsep



BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro* pada liposom yang telah disonikasi dengan perlakuan berupa penambahan NaCl dan $CaCl_2$ pada pH 7. Objek diamati pada hari ke-0, hari ke-7, hari ke-30, hari ke-60 dan hari ke-90.

Penelitian ini dilakukan di Fakultas Kedokteran UI selama 3 bulan. Preparasi liposom di laboratorium Ilmu Farmasi Kedokteran FKUI. Sonikasi dilakukan di laboratorium Farmakologi FKUI. Pembuatan larutan NaCl dan $CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7 dilakukan di laboratorium Biokimia FKUI. Perhitungan jumlah liposom dilakukan dengan menggunakan mikroskop yang dihubungkan ke kamera Sony CCD-IRIS *color video camera* di laboratorium Fisika FKUI, pada bulan April-Juli 2007.

Besar sampel penelitian ini dihitung dengan rumus Federer, dan didapatkan besar sampel minimal 2. Sehingga perhitungan jumlah liposom dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali.

Penelitian dimulai dengan pembuatan liposom EPC TEL 2,5 berdasarkan metode Purwaningsih, dkk[16]. Setelah disonikasi, liposom dibagi ke dalam 3 kelompok pada pH 7, yaitu:

- Kelompok kontrol tanpa pemaparan garam
- Kelompok liposom dengan pemaparan NaCl
- Kelompok liposom dengan pemaparan $CaCl_2$

Untuk penanda bercak, preparat liposom ditambahkan quinakrin 2%, sebanyak 0,195 mg.

Observasi kestabilan liposom dengan mengukur diameter pada hari ke-0, 7, 30, 60, dan 90. Setiap kelompok liposom dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X dan dilakukan pengambilan 10 foto pada 10 lapang pandang, serta pengambilan 1 video selama 15 detik, untuk setiap kelompok perlakuan. Perhitungan jumlah liposom dan pengukuran liposom

dilakukan secara manual berdasarkan skala ukur yang telah ditentukan. Ditentukan 2 kategori ukuran liposom ≤ 100 nm atau dinyatakan stabil dan >100 nm atau dinyatakan tidak stabil.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Fosfatidilkolin dari kuning telur (Egg-yolk Phosphatidylcholine=EPC) dari Lipoid®. Tetraeter lipid (TEL) *Thermoplasma acidophilum* diperoleh dari IFB Halle Jerman. Chloroform, Ethanol 70%, penanda bercak Quinakrin 2% dan Aquabides didapat dari laboratorium Ilmu Farmasi Kedokteran FKUI. NaCl 150 mOsmol pH 7 dan $CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7 didapat dari laboratorium Biokimia FKUI.

3.2.2 Alat

Rotavapor, pompa vakum, penangas air dari Bűchi untuk preparasi liposom EPC TEL 2,5. Kamera Sony CCD-IRIS *color video camera*, Mikroskop Olympus, Program Win USB TV version 2.0, dan komputer, untuk pengamatan liposom. Kaca preparat berskala Olympus sebagai skala ukur yang ditentukan untuk diameter liposom.

Alat lain yang digunakan adalah : Sonicator Branson type 1510, neraca listrik Mettler AE-200, botol berukuran 20 ml, Spuit 2,5 ml, Spuit 2,5 µl, Hamilton *syringe*.

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Preparasi Liposom

- Membuat sediaan liposom:

1. Buchi Rotavapor dipanaskan, kemudian air dituang ke dalam penangas air dengan jumlah yang sesuai agar labu dapat terendam.

2. EPC dan TEL (kadar TEL 2,5% dari mol EPC) ditimbang sesuai dengan perhitungan yang terdapat pada lampiran.
3. Setelah EPC dan TEL dicampurkan, kemudian ditambahkan Cloroform dan Etanol dengan perbandingan 1:1 (masing-masing 5 ml).
4. Campuran EPC-TEL, Cloroform, Etanol dimasukkan ke dalam labu yang berisi *beads*.
5. Campuran didispersi dengan Buchi Rotavapor selama 2 jam. Air di dalam penangas air dipertahankan bersuhu 40^{o}C dan tekanan pada vakum dipertahankan 200 barr dan setelah kering tekanan pada vakum dipertahankan di bawah 50 barr.
6. Setelah campuran mengering, ditambahkan Aquades hingga volume mencapai 50 ml (sesuai dengan volume yang dibutuhkan), kemudian dirotasi kembali sampai larutan homogen.

- Menyiapkan liposom dalam berbagai ukuran.

1. Campuran dibagi menjadi 3 bagian (masing-masing berisi 15 ml) kemudian dilabel menjadi sampel I (kontrol), II (sonikasi) dan III (ekstrusi).
2. Sampel II diberikan perlakuan berupa sonikasi yang dilakukan di Departemen Farmakologi FKUI selama 60 menit, dengan diberi jeda setiap 15 menit.
3. Sampel I dan III akan digunakan pada penelitian lain.
4. Setelah diberikan perlakuan, ditambahkan *Quinakrin* pada sampel sonikasi sesuai perhitungan pada lampiran.
5. Sampel dibagi menjadi 10 bagian.
6. Kemudian diambil dua bagian, dan kedua bagian tersebut diberi label dengan NaCl pH 7 dan $CaCl_2$ pH 7.
7. Sisa sampel sonikasi akan digunakan oleh peneliti lain.
8. Larutan NaCl pH 7 dan $CaCl_2$ pH 7 ditambahkan ke dalam sampel sesuai dengan labelnya dengan perbandingan 1:1 terhadap liposom.

3.3.2 Pengukuran dan Perhitungan Liposom

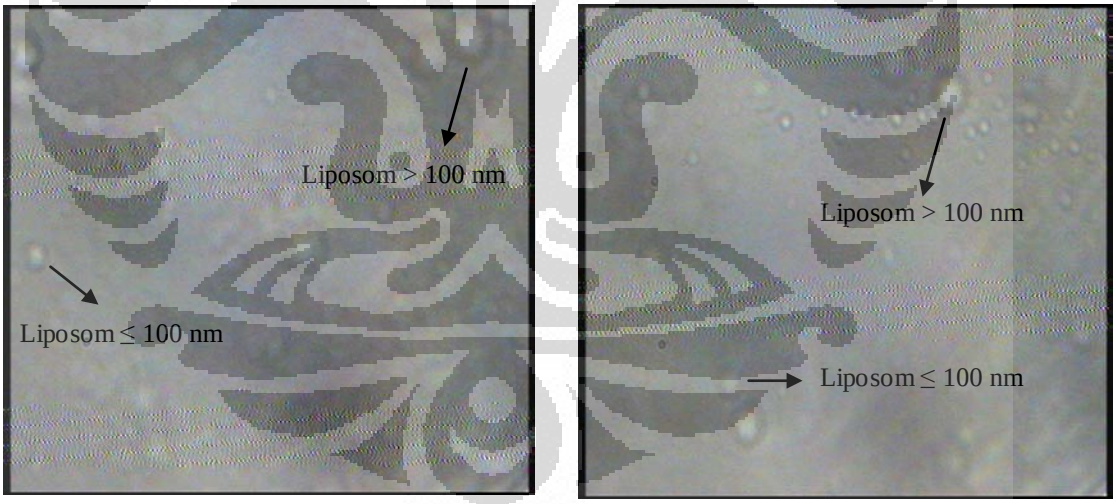
- Pengukuran dilakukan pada hari ke-0, 7, 30, 60, 90 penyimpanan.

1. Kaca preparat dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian dibiarkan mengering.
2. Mikroskop kamera disiapkan dan ditentukan garis ukur untuk mengukur besar liposom.
3. 25 μL liposom yang telah dicampur dengan *Quinakrin* dan garam fisiologis diteteskan pada kaca preparat.
4. Kemudian ditutup dengan kaca penutup, dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 x (dapat disesuaikan).
5. Fokus ditentukan, dan kemudian dicatat.
6. Sepuluh foto diambil pada 10 lapang pandang, kemudian direkam dengan durasi 15 detik. Dan data yang didapat disimpan.
7. Langkah yang sama diulangi pada tiap sampel yang diuji.
8. Diameter liposom dihitung berdasarkan skala pada preparat, dikategorikan menjadi > 100 nm dan ≤ 100 nm.
9. Data yang didapat dianalisis dengan metode Kruskal-Wallis *one-way* ANOVA.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

Telah terbuktinya liposom EPC-TEL 2,5 dapat mengikat obat metilprednisolon palmitat lebih baik, dan menunjukkan efek terapi imunologik, menjadi dasar pemikiran pengujian kestabilan liposom EPC-TEL 2,5 secara kimia[16-17] . Penelitian ini dikembangkan dengan melibatkan pemaparan garam-garam fisiologis yang merupakan komponen elektrolit utama dalam tubuh manusia dan sering digunakan sebagai cairan infus, antara lain Na^+, Ca^{2+}, dan Cl^- [18].

Gambar 7 menunjukkan contoh hasil pengamatan partikel liposom pada pengamatan hari-90 setelah penyimpanan pada suhu 4^{o}C. Gambar 7 (i) merupakan liposom dengan paparan NaCl 150 mOsmol pH 7 dan Gambar 7 (ii) merupakan liposom dengan paparan $CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7. Didapatkan dua kategori ukuran liposom ≤ 100 nm dan > 100 nm.



(i) **(ii)**

Gambar 7. Hasil Foto Contoh. NaCl 150 mOsmol pH 7 (i). $CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7 (ii)

Hasil perhitungan jumlah liposom dapat dilihat pada Tabel 1. Pada Tabel 1 diperlihatkan jumlah liposom yang berukuran ≤ 100 nm dan > 100 nm, pada liposom kontrol tanpa perlakuan, liposom dengan paparan NaCl dan $CaCl_2$,

pada hari 0 hingga hari 90. Liposom kontrol dicantumkan sebagai perbandingan, namun tidak dimasukkan dalam analisis. Berdasarkan parameter kestabilan yang digunakan, yaitu diameter liposom tidak bertambah, maka jumlah liposom yang > 100 nm tidak bertambah, sehingga hanya data mengenai jumlah liposom > 100 nm yang akan dianalisis. Data yang didapat merupakan data kategorial (ordinal), lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan, sehingga data akan dianalisis dengan metode Kruskal-Wallis *one-way* ANOVA[41].

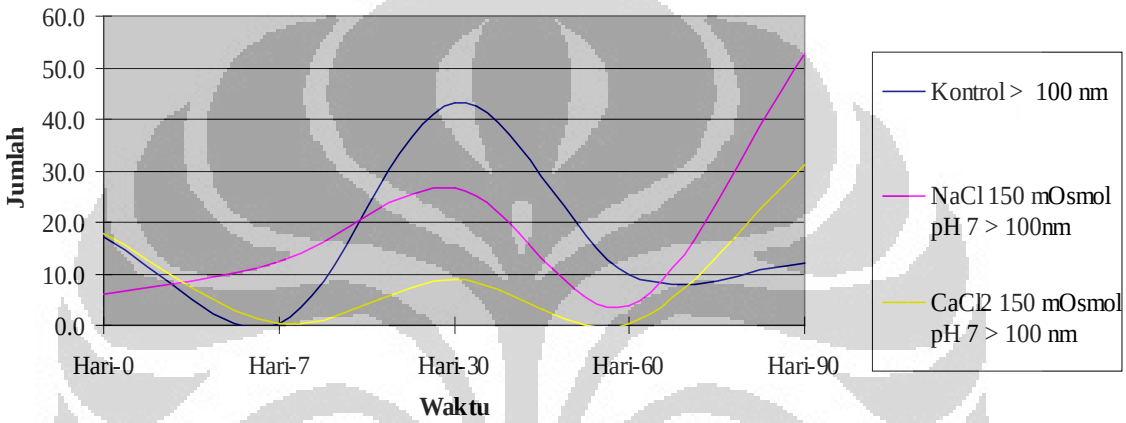
Tabel 1. Hasil Pengukuran Liposom

		Kontrol		**NaCl 150 mOsmol pH 7**		**$CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7**	
		≤ 100nm	**> 100 nm**	**≤ 100 nm**	**> 100nm**	**≤ 100 nm**	**> 100 nm**
Hari-0	**Data 1**	299	9	219	1	266	9
	Data 2	215	4	171	0	185	2
	Data 3	227	39	268	17	243	42
Rata-Rata		**223,7**	**17,3**	**219,3**	**6**	**231,3**	**17,7**
Hari-7	**Data 1**	224	0	252	20	363	0
	Data 2	218	1	227	8	215	0
	Data 3	209	0	209	9	189	1
Rata-Rata		**217**	**0,3**	**229,3**	**12,3**	**255,7**	**0,3**
Hari-30	**Data 1**	287	115	317	39	231	7
	Data 2	180	3	197	5	173	1
	Data 3	286	12	244	36	228	19
Rata-Rata		**251**	**43,3**	**252,7**	**26,7**	**210,7**	**9**
Hari-60	**Data 1**	349	9	662	2	386	0
	Data 2	61	0	98	0	47	0
	Data 3	231	21	479	9	225	1
Rata-Rata		**213,7**	**10**	**413**	**3,7**	**219,3**	**0,3**
Hari-90	**Data 1**	269	17	232	91	472	65
	Data 2	60	5	60	0	67	1
	Data 3	161	14	216	67	370	27
Rata-Rata		**163,3**	**12**	**169,3**	**52,7**	**303**	**31**

Hasil analisis statistik didapatkan nilai probabilitas 0,142. yang menunjukkan semua data yang didapat tidak berbeda bermakna pada setiap perlakuan liposom selama penyimpanan hingga 90 hari. Sehingga dapat

disimpulkan bahwa liposom EPC-TEL 2,5 tetap stabil dengan pemaparan NaCl maupun $CaCl_2$ 150 mOsmol pada pH 7, hingga hari ke 90.

Gambar 8 menunjukkan gambaran data mengenai jumlah liposom > 100 nm pada pengamatan hari-0 hingga hari-90, pada liposom dengan kontrol tanpa pemaparan garam, NaCl pH 7 maupun $CaCl_2$ pH 7. Terkesan bahwa terjadi peningkatan dan penurunan pada jumlah liposom dengan NaCl maupun $CaCl_2$ pada setiap hari pengamatan, namun secara statistik jumlah liposom tidak berbeda secara bermakna pada diameter liposom > 100 nm.



Gambar 8. Grafik Data Jumlah Liposom

Karena tidak tersedia *partikel sizer* ataupun program komputer yang dapat mengukur partikel liposom secara pasti, data hanya bisa dikategorikan menjadi dua :≤ 100 nm dan > 100 nm. Sehingga tidak dapat dilakukan analisis data secara numerik.

Keterbatasan alat menyebabkan penambahan diameter liposom, yang merupakan salah satu parameter kestabilan tidak dapat diukur dengan tepat. Komposisi liposom tidak dapat diamati, sehingga tidak dapat memastikan apakah TEL tetap stabil (tidak terlepas) dari EPC walaupun terpapar garam dalam waktu penyimpanan 90 hari pada suhu 4^{o}C.

Bila ditinjau dari lipid yang digunakan, EPC (*Egg-yolk Phosphatidyl Choline*) adalah bahan yang lazim digunakan untuk pembuatan liposom konvensional[17], yang akan menghasilkan liposom bermuatan netral. Liposom dengan muatan permukaan netral mempunyai kecenderungan untuk beragregasi,

sehingga meningkatkan ukuran liposom. Ukuran liposom mempengaruhi distribusi partikel dan klirens obat. Kecepatan degradasi liposom oleh RES (*Reticuloendoplasmic Systems*) juga meningkat seiring dengan ukuran vesikel[42]. Untuk mengurangi agregasi dan mencegah pengenalan oleh RES, dapat dilakukan modifikasi pada permukaan membran liposom, salah satunya dengan penambahan TEL.

Ukuran partikel liposom juga ditentukan oleh komposisi lipid dan cara pembuatan liposom. Kombinasi EPC dan TEL dari berbagai rasio (3:1;1:1; atau 1:3) akan menghasilkan ukuran partikel liposom yang cukup besar, antara 169-792 nm[43]. Dengan sonikasi akan dihasilkan liposom satu lapis berukuran kecil atau SUV, namun sonikasi meningkatkan kemungkinan terjadinya oksidasi lipid, sehingga liposom menjadi tidak stabil[28].

Penambahan TEL ke dalam komposisi lipid dimaksudkan untuk menstabilkan liposom, karena TEL mempunyai struktur berupa 2 gugus kepala polar dengan tebal membran sekitar 4 nm, sehingga diharapkan dapat berinkorporasi dengan membran liposom menyerupai pasak[21]. Gambaran skematisnya ditunjukkan pada Gambar 9. Penambahan TEL juga dapat menambah muatan negatif pada permukaan membran liposom, sehingga liposom tetap stabil. Selain itu TEL terbukti dapat mengurangi kerentanan liposom terhadap oksidasi pada keadaan tinggi proton, karena TEL tidak mempunyai struktur ikatan rangkap dan mengandung ikatan eter lipid[36]

Gambar 9. Gambaran skematis inkorporasi TEL dalam membran dwilapis lipid dari EPC[16]. TEL ditunjukkan dengan (●).

Uji stabilitas liposom yang berasal dari TEL *Thermoplasma acidophilum* menunjukkan, bahwa TEL ini cukup stabil pada pH rendah dibandingkan pada pH netral ataupun alkalis. Kombinasi TEL dengan lesitin telur juga menunjukkan kestabilan yang cukup tinggi. Uji stabilitas liposom TEL diukur berdasarkan ukuran partikel dengan menggunakan *particle sizer* dan penglepasan karboksifluoresens dari membran liposom[43].

Kestabilan liposom TEL dari *Thermoplasma acidophilum* telah dibuktikan oleh Freisleben, HJ., dan menunjukkan bahwa liposom ini mempunyai kestabilan yang cukup tinggi. Namun liposom yang digunakan merupakan TEL murni dan pada kombinasi lesitin telur dengan TEL dalam konsentrasi yang tinggi, dengan perbandingan lipid dan TEL sebesar 1:5 hingga 5:1[36].

Kestabilan EPC-TEL 2,5 telah dibuktikan oleh Purwaningsih dkk.[16], dengan menggunakan TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius*. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa pada suhu kamar (24-26^{o}C) liposom tetap stabil hingga penyimpanan selama 3 hari. Dan pada suhu 20^{o}C liposom masih tetap stabil pada hari ke-9. Penggunaan TEL yang hanya 2,5 mol %, mempertimbangkan segi keamanan untuk pemakaian jangka panjang, karena belum ditemukan mekanisme pemecahan atau metabolisme TEL secara in vivo[21].

Penelitian tentang kestabilan liposom EPC-TEL ini, membuktikan bahwa liposom EPC-TEL cukup stabil dengan penambahan garam NaCl dan $CaCl_2$ 150 mOsmol dalam penyimpanan 90 hari pada suhu 4^{o}C, walaupun konsentrasi TEL yang digunakan sangat rendah, yaitu 2,5 mol %.

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Liposom, yang tersusun dari EPC dan TEL 2,5 mol % dari *Thermoplasma acidophilum*, dengan paparan garam fisiologis dalam waktu penyimpanan 90 hari pada suhu 4^oC, stabil tanpa dipengaruhi jenis garam. Liposom yang terpapar dengan NaCl 150 mOsmol pH 7 maupun yang terpapar $CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7, menunjukkan ukuran yang tetap stabil dalam waktu penyimpanan 90 hari pada suhu 4^oC.

5.2 Saran

Untuk menilai kestabilan liposom dengan lebih akurat, tanpa mengabaikan parameter kestabilan lainnya, perlu digunakan *partikel sizer* atau program komputer *image plus* untuk mengukur diameter dan penambahan diameter liposom secara lebih pasti. Selain itu perlu dilakukan pengamatan mengenai inkorporasi TEL pada liposom setelah terpapar garam fisiologis dan penyimpanan selama 90 hari pada suhu 4^oC, untuk memastikan kestabilan liposom. Liposom EPC TEL 2,5 masih memerlukan penelitian lebih lanjut untuk menguji kestabilan secara fisika dan biologi serta uji klinisnya setelah dikombinasikan dengan obat-obatan tertentu. Preparat liposom EPC-TEL 2,5 bisa digunakan maupun disimpan selama 90 hari dalam larutan intravena yang mengandung NaCl atau $CaCl_2$ 150 mOsmol pada pH 7, tanpa terjadi penggumpalan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Krensky AM, Vincenti F, Bennett WM. Drugs used for immunosuppression : Immuno-supressive agents. In : Goodman and Gilman (eds). *The pharmacological Basis of Therapeutics,* 11th ed. McGraw-Hill Companies 2006:1405-28.
2. Chabner BA, Amrein PC, Draker B, Michaelson MD, et al. Antineoplastic agents. In : Goodman and Gilman (eds). *The pharmacological Basis of Therapeutics,* 11th ed. McGraw-Hill Companies 2006:1315-89.
3. Schimmer BP, Parker KL. Adrenocorticotropic hormone, adrenocortical steroids and their synthetic analog : Inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormone. In : Goodman and Gilman (eds). *The pharmacological Basis of Therapeutics,* 11th ed. McGraw-Hill Companies 2006:1587-1612.
4. Lasic DD (ed). Liposomes As A Drug Delivery System. In: *Liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993: 265-324.
5. Lasic DD. Liposomes. Science and Medicine 1996 (May-June): 34-43.
6. Sykes P (ed). Structure, reactivity, and mechanism. In : *A Guidebook to Mechanism Medicine*. The Parthenon Publishing Group 1999; 233-48.
7. Lasic DD (ed). Site-spesific drug delivery. In : *Liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993; 441-71.
8. Sinaga E. Sintesis, evaluasi aktivitas biologis, dan analisis struktur kimia senyawa-senyawa peptida sintetik yang dapat memodulasi *junction* interseluler. *Disertasi Doktor*, Juni 2001.
9. Mishina EV, Jusko WJ. Selected tissue distribution of liposomal methylprednisolone in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1994b;84:47-52.
10. Mishina EV, Straubinger RM, Psyzczynski NA, Jusko WJ. Enhancement of tissue delivery and receptor occupancy of methylprednisolone in rats by a liposome formulation. *J Pharma Res* 1993;10(10);1402-9.
11. Freise CE, Liu T, Hong K, et al. The increased efficacy and decreased nephrotoxicity of cyclosporine liposome. *Tansplantation* 1994;579(6):928-32.

12. 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.
13. Michel C, Groth N, Herrling T, Rudolph P, Fuchs J, Kreuter J, Freisleben HJ. Penetration of spin-labeled retinoic acid from liposomal preparation into the skin of SKHI hairless mice. Measurement by EPR tomography. *Int J Pharmac* 1993;98:131-9.
14. Huang SK, Mayhew E, Gilani S, Lasic DD, Martin FJ, Papahadjopoulos D. Pharmacokinetics and therapeutics of sterically stabilized liposoms in mice bearing C-26 colon carcinoma. *Cancer Research* 1992;52:6774-81.
15. Davidson RN, Di Martino L, Gradoni L, et a. Liposomal amphotericin B(amBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis : a multi-centre trial. *Quart J Med* 1994;87:75-81.
16. Ernie HP, Freisleben HJ, Sadikin M. Peningkatan inkorporasi metilprednisolon palmitat pada liposom yang mengandung tetraetil lipid dari membran *Sulfolobus acidocaldarius* membentuk sediaan baru liposomal metilprednisolon palmitat. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2002;1(1):24-30.
17. Wawaimuli A, FD Suyatna, Ernie H Purwaningsih, Hedi R Dewoto. Peningkatan Efek Antiinflamasi Sediaan Metilprednisolon dalam bentuk Liposom. MKI 2005;56(1):17-22.
18. Irawan AM. Cairan Tubuh, Elektrolit, dan Mineral. 2007. Diunduh dari: http://www.pssplab.com [14 Maret 2008]
19. Darmawan I. Terapi Cairan Parenteral. April 2007. Diunduh dari: http//www.majalah-farmacia.com [14 Maret 2008]
20. RRC New et al. Liposomes a practical aproach. Oxford: IRL PRESS 1990: 1-31; 105-10; 221-7.
21. Lasic DD (ed). Chemistry of Lipids and Liposoms. In: *Liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993: 1-42.
22. Schwendener et al. Liposomes: General Properties. 1990: Acta 1026:69-79.
23. Daniels R. Liposome – Classification, Processing Technologies, Industry Application and Risk Assessment. In: Galenic Principles of Modern Skin Products, Issue 25, Skin Care Forum. 2006.

24. Best M and Friedrich. Liposome-forming Compositions. 2006. Available at: http://www.freshpatents.com/liposome-forming-compositions-dt200608.17ptan20060182792.php?
25. Zubay GL (ed.). Lipids and membranes. In : *Biochemistry*. 4th ed. Wm. C. Brown Publisher. 1998; 443-61
26. Stern J. Freisleben HJ, Janku S, Ring K. Black Lipid Membranes of Tetraether Lipids from *Thermoplasma acidophilum.* Biochim Biophys Acta 1992; 1128: 227-36.
27. Freisleben HJ. Henkel L, Gutermann R, Rudolph P, John G, Sternberg B, Winter S, Ring K. Fermentor Cultivation of *Thermoplasma acidophilum* for the Production of Cell Mass and the Main Phospholipid Fraction. Appl Microbial Biotech 1994; 40: 745-52.
28. Lasic DD (ed). Preparation of Liposomes. In: Liposomes from Physics to Application. Elsevier Science Publisher BV 1993: 63-107.
29. Anonymous. Biotechnology: The Charaterization and Use of Liposomes – Supplier Data by Malvern. In: Biotechnology: The Characterization and Use of Liposomes, Application Note by Malvern Instruments. 2006. Available at: www.azom.com.
30. Oussoren C, Storm G, Crommelin DJA and Senior J. Liposomes for sustained drug release. In: Sustained-release Injectable Products (Senior J and Radomsky M, ed.). Interpharm Press, Engelwood, Colorado, USA. 2000: 137-80.
31. Storm G and Crommelin DJA. Liposomes: Quo Vadis?. Pharmaceutical Science & Technology Today 1. 1998: 19-31.
32. New RRC. Characterization of Liposomes. In: Ner RRC (ed). Liposomes. A Practical Approach. IRL Press 1991: 105-61.
33. Crommelin D, Bos G, Storm G. Liposomes – Successful Carrier Systems for Targeted Drug Delivery. 2001.
34. Freisleben HJ, Neisser C, Hartmann M, Rudolph P, Geck P, Ring K, Müller WEG. Influence of the main Phospholipid (MPL) from *Thermoplasma acidophilum* and of liposomes from MPL on living cells: cytotoxicity and mutagenicity. J Liposomes 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 Archaebacterium *Thermoplasma acidophilum* in mice. J Liposome Research 1995;5(1): 215-23.
36. 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.
37. Freisleben HJ, Antonopoulus E, Balakirev M, Balairev L, Hartmann K, et,al. Tetraether Lipid Derivatives and Liposoms and Lipid Agglomerates Containing Tetraether Lipid Derivatives, and Use There Of. 2001. Diunduh dari: http://www.freepatentsonline.com/6316260.html [4 Desember 2006]
38. 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; 39-49.
39. Feldman SR. Sodium Chloride. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc. Published Online 2005. doi:10.1002/0471238961.191.5040902051820.a01.pub2
40. Anonim. Calcium Chloride. 2005 Diunduh dari : http://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_Chloride [1 April 2008]
41. Dahlan S. Statistika Untuk Kedokteran dan Kesehatan. Arkans : Jakarta. 2006: 1-21.
42. Jufri M. Arah dan Perkembangan Liposom Drugs Delivery Systems. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2004; I(2): 59-68
43. Freisleben HJ. The main phospholipid of the Archaebacterium *Thermoplasma acidophilum.* Does the Liposome Technology with this unique tetraether lipid provide novel perspectives for Biochemistry and Medicine? (Title translated from German to English). Habilitation at Johann-Wolfgang, Goethe-University, Frankfurt am Main, 1992.

LAMPIRAN 1

Perhitungan EPC dan TEL

Larutan liposom yang dibutuhkan adalah sebanyak 50 ml. Dalam setiap 1 ml larutan liposom dibutuhkan EPC sebanyak 10 mMolar, sehingga massa EPC yang dibutuhkan 390 mg, sesuai perhitungan :

$$M = \frac{\text{massa(gr)}}{Mr \times Vol(L)}$$

Massa EPC = M x Mr x Vol(L)

= $(10 \times 10^{-3}) \times 780 \times (50 \times 10^{-3})$

= 0,39 gr

= 390 mg

Sehingga dibutuhkan 390 mg EPC.

TEL yang dibutuhkan sebanyak 2,5 % dari mMolar EPC, sehingga TEL yang dibutuhkan sebanyak 0,25 mMolar.

Massa EPC yang dibutuhkan 18,605 mg, sesuai perhitungan :

Massa TEL 2,5 = M x Mr x Vol(L)

= $(0{,}25 \times 10^{-3}) \times 1488{,}401 \times (50 \times 10^{-3})$

= $18{,}605 \times 10^{-3}$ gram

= 18,605 mg

Sehingga dibutuhkan 18,605 mg TEL.

Perhitungan NaCl dan $CaCl_2$

Volume NaCl yang dibutuhkan adalah 20 ml, 150 mMolar, maka massa yang dibutuhkan:

Massa NaCl = M x Mr x Vol(L)

= $(150 \times 10^{-3}) \times 58{,}5 \times (20 \times 10^{-3})$

= 0,1755 gr

= 175,5 mg

Sehingga untuk membuat larutan NaCl 150 mOsmol pH 7 dibutuhkan NaCl sebanyak 175,5 mg.

Volume $CaCl_2$ yang dibutuhkan adalah 20 ml, 150 mMolar, maka massa yang dibutuhkan : Massa $CaCl_2$ = M x Mr x Vol(L)

= $(150x10^{-3})$ x 111 x $(20x10^{-3})$

= 0,333 gr

= 333 mg

Sehingga untuk membuat larutan $MgCl_2$ 150 mOsmol pH 7 dibutuhkan $MgCl_2$ sebanyak 333 mg.

Perhitungan Quinakrin

Untuk setiap 50 gram EPC dibutuhkan 25 mg quinakrin. Dengan demikian quinakrin yang dibutuhkan untuk 390 mg EPC, adalah 0,195 mg.

LAMPIRAN 2

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

Dari rumus di atas dapat dilakukan perhitungan besar sampel sebagai berikut:

$$t = 50$$

maka didapatkan:

$$(n-1)\,(50-1) \geq 15$$

$$(n-1)\,49 \geq 15$$

$$(49n-49) \geq 15$$

$$49\,n \geq 64$$

$$n \geq 64/49$$

Dari hasil perhitungan di atas, maka dalam penelitian ini peneliti menggunakan minimal 2 buah sampel.

LAMPIRAN 3

Hasil Analisis Statistik Kruskal Wallis

Ranks

	Perlakuan yang dilakukan pada liposom	N	Mean Rank
Jumlah liposom lebih 100nm	$CaCl_2$ hari 0	3	19.83
	$CaCl_2$ hari 7	3	6.00
	$CaCl_2$ hari 30	3	16.00
	$CaCl_2$ hari 60	3	6.00
	$CaCl_2$ hari 90	3	20.67
	NaCl pH 7 hari 0	3	11.67
	NaCl pH 7 hari 7	3	19.67
	NaCl pH 7 hari 30	3	22.00
	NaCl pH 7 hari 60	3	12.17
	NaCl pH 7 hari 90	3	21.00
	Total	30	

Test Statistics(a,b)

	jumlah liposom lebih 100nm
Chi-Square	13.477
Df	9
Asymp. Sig.	.142

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Perlakuan yang dilakukan pada liposom

H_0 = Tidak terdapat perbedaan bermakna antara liposom NaCl dengan $CaCl_2$ pada hari-0, 7, 30, 60, dan 90.

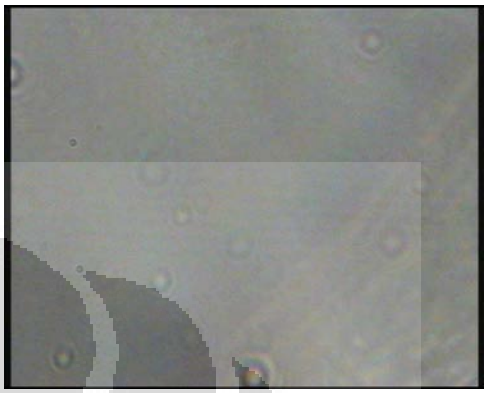
H_1 = Terdapat perbedaan bermakna antara liposom NaCl dengan $CaCl_2$ pada hari-0, 7, 30, 60, dan 90.

LAMPIRAN 4

Hasil Foto Liposom

1. Liposom hari-1

NaCl 150 mOsmol pH 7



$CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7

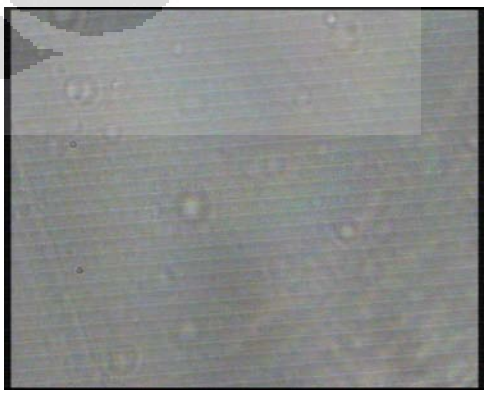
2. Liposom hari-7

NaCl 150 mOsmol pH 7

$CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7

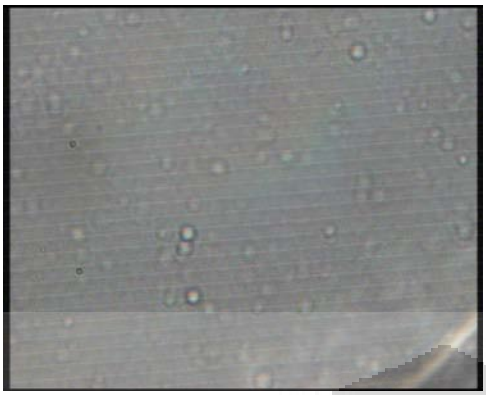
3. Liposom hari-30

NaCl 150 mOsmol pH 7

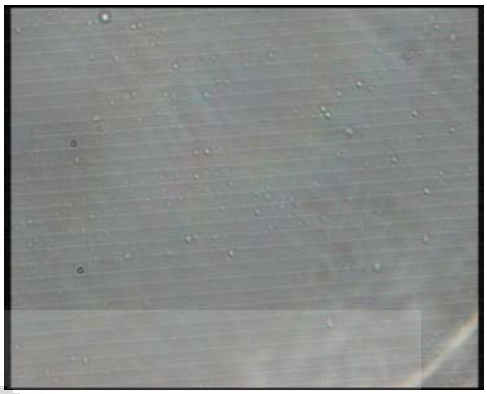


$CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7

4. Liposom hari-60



NaCl 150 mOsmol pH 7



$CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7

5. Liposom hari-90

NaCl 150 mOsmol pH 7

$CaCl_2$ 150 mOsmol pH 7