



**UJI STABILITAS LIPOSOM TETRA ETER LIPID (EPC-
TEL 2,5) SONIKASI DENGAN PEMAJANAN
LARUTAN $MgCl_2$ 350 MOSMOL PH 7
PADA SUHU 4⁰ CELCIUS**

OLEH
LISA LISTIARINI
0105001006

Untuk Memenuhi Persyaratan Kelulusan sebagai Sarjana Kedokteran pada
Fakultas Kedokteran Indonesia

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA, JUNI 2009

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yesus Kristus atas berkat, rahmat, dan anugerahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi dengan baik. Penyusunan skripsi ini merupakan salah satu syarat kelulusan untuk memperoleh gelar sarjana Kedokteran dari Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Dalam kesempatan ini, penulis dengan penuh kerendahan hati dan hormat menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dra. Ida Z Hafiz, Apt Msi sebagai Dosen Pembimbing yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, dan dorongan yang tak kenal lelah dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini. Beliau dengan sabar mengoreksi dan memberi penjelasan saat pembuatan skripsi ini.
2. DR. dr. Ernie H. Purwaningsih yang telah menyediakan, mendukung, dan membantu memperoleh dana dalam penelitian "Uji Stabilitas Liposom".
3. DR.dr. Saptawati Bardosono, MSc selaku Ketua Modul Riset. Beliau juga yang telah mengajari saya ilmu statistik sehingga saya dapat mengolah data hasil penelitian dengan baik.
4. Seluruh staf pengajar dan karyawan Departemen Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
5. Seluruh staf pengajar dan karyawan Departemen Fisika Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
6. Kedua orang tua penulis yang telah mendoakan, memberikan semangat, dan mendukung baik secara moril dan materiil.
7. Kakak dan adik tersayang yang telah mendoakan dan memberi semangat dalam penyusunan skripsi ini.
8. Rekan-rekan angkatan 2005 Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, khususnya rekan-rekan sepenelitian liposom yang telah bekerja sama dalam penelitian sehingga dapat berjalan dengan lancar
9. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung selama penelitian dan penulisan skripsi ini

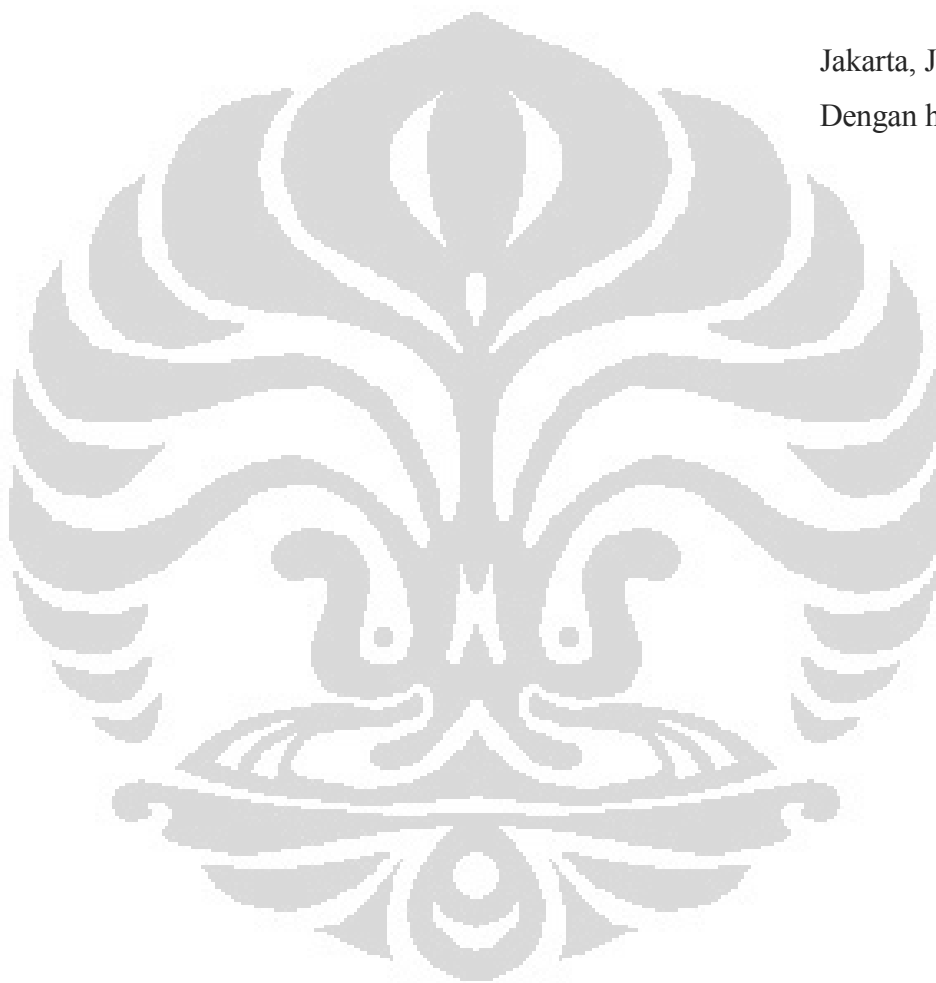
Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini yang dikarenakan oleh pengalaman dan keterbatasan dari penulis. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak untuk penyempurnaan penulisan ini.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu kedokteran di masa mendatang.

Jakarta, Juni 2009

Dengan hormat,

Penulis



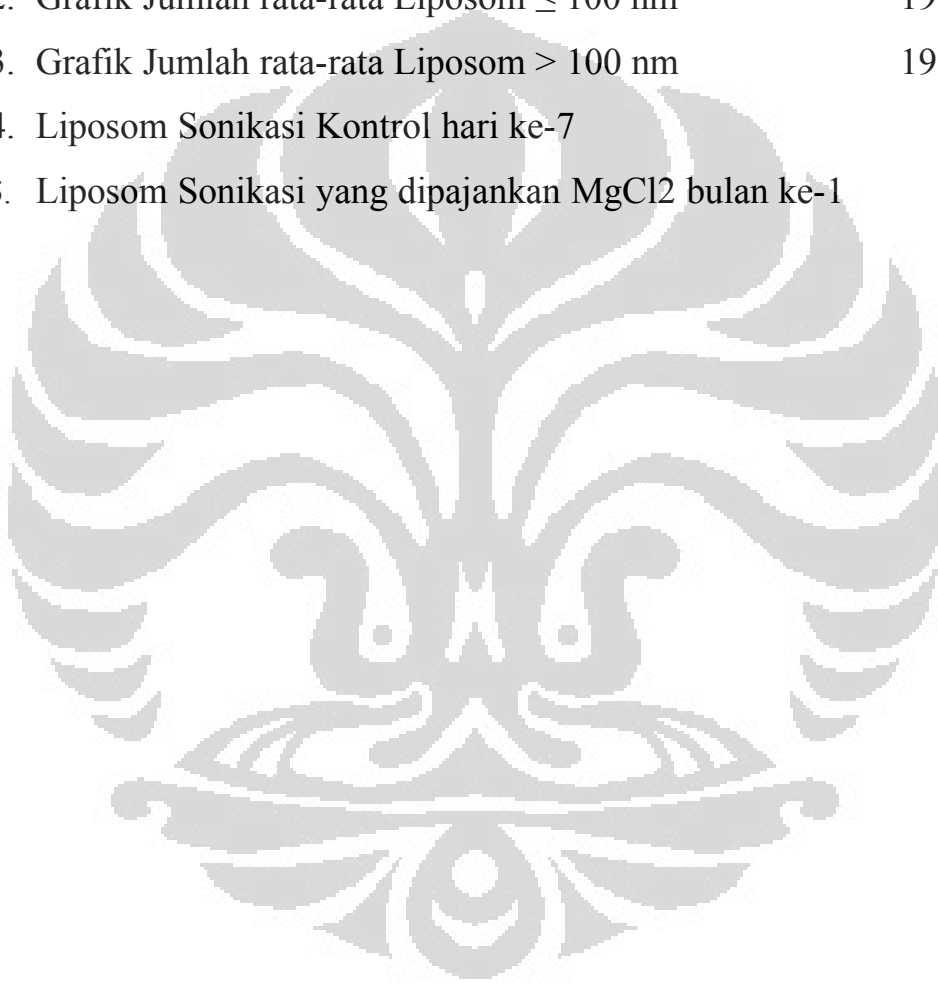
DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang Masalah	1
I.2 Rumusan Masalah	2
I.3 Hipotesis	2
I.4 Tujuan Penelitian	2
I.5 Manfaat Penelitian	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
II.1 Liposom	3
II.1.1 Struktur Liposom	3
II.1.2 Peranan Liposom sebagai Pembawa Obat	4
II.2 <i>Thermoplasma acidophilum</i> dan Tetra Eter Lipid	6
II.2.1 <i>Thermoplasma acidophilum</i>	6
II.2.2 Tetra Eter Lipid	7
II.3 Magnesium Klorida	8
II.4 Kerangka Konsep	9
BAB III METODOLOGI	10
III.1 Desain Penelitian	10
III.2 Tempat dan Waktu	10

III.3 Besar Sampel	10
III.4 Alat dan Bahan	11
III.5 Analisis Data	15
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	17
IV.1 Hasil	17
IV.2 Pembahasan	19
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	22
V.1 Kesimpulan	22
V.2 Saran	22
DAFTAR PUSTAKA	23
LAMPIRAN	27

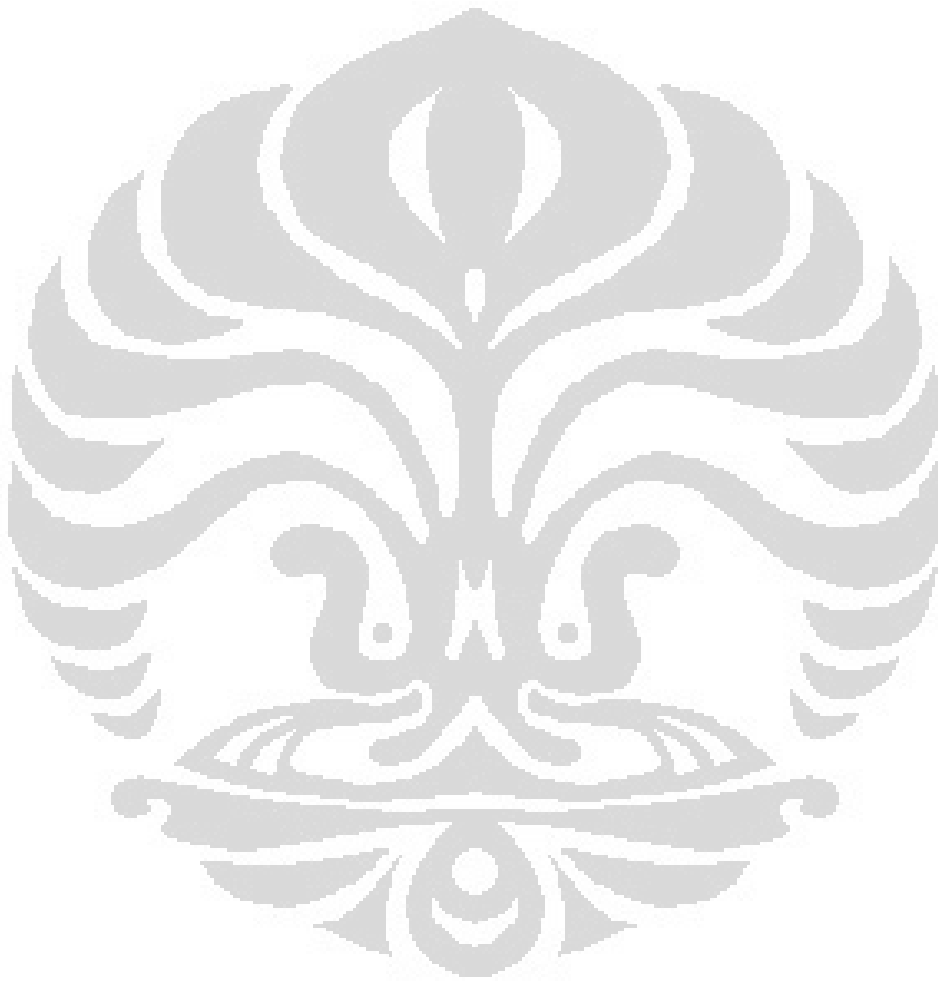
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Liposom	4
2. Grafik Jumlah rata-rata Liposom ≤ 100 nm	19
3. Grafik Jumlah rata-rata Liposom > 100 nm	19
4. Liposom Sonikasi Kontrol hari ke-7	20
5. Liposom Sonikasi yang dipajankan MgCl ₂ bulan ke-1	21



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Perhitungan Jumlah Liposom Berdasarkan Diameter	18



LEMBAR PERSETUJUAN

**UJI STABILITAS LIPOSOM TETRA ETER LIPID (EPC-TEL
2,5) SONIKASI DENGAN PEMAJANAN
LARUTAN $MgCl_2$ 350 MOSMOL PH 7
PADA SUHU 4⁰ CELCIUS**

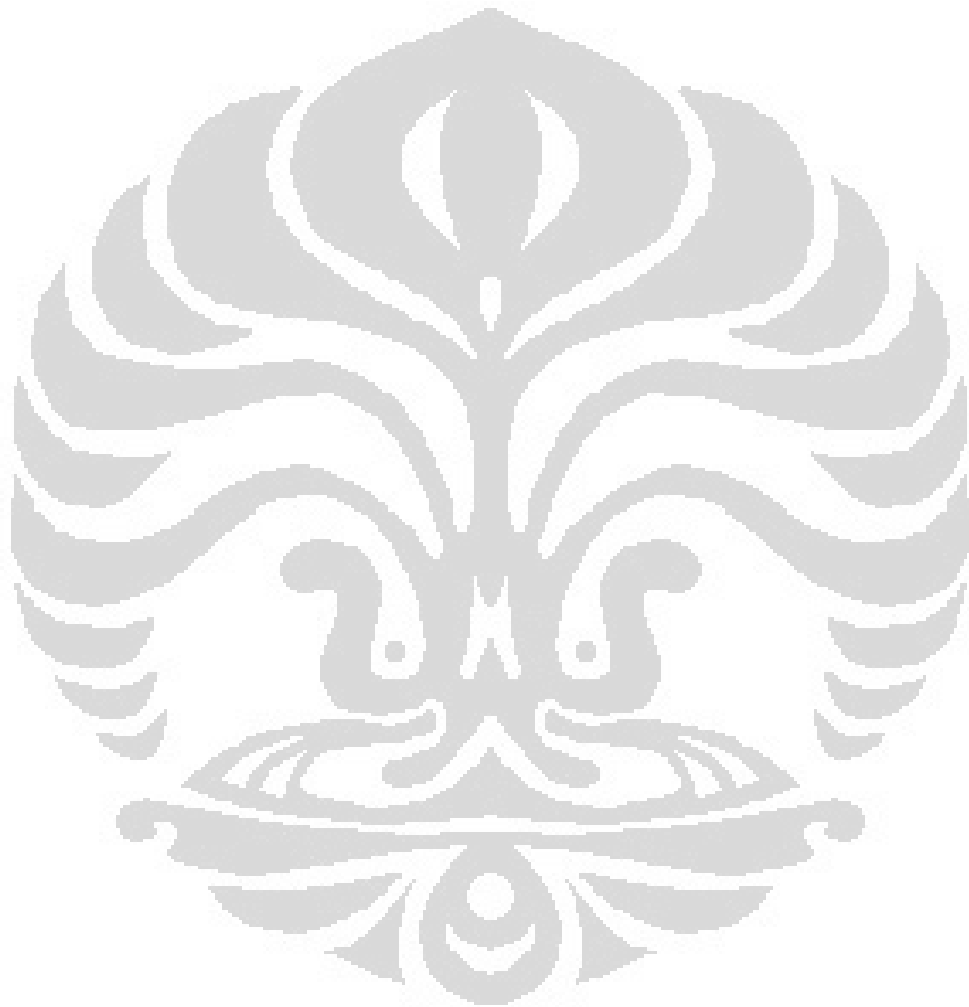
LISA LISTIARINI
0105001006

PEMBIMBING

Dra. Ida Z. Hafiz, Apt Msi
NIP 130 932 210

MENGETAHUI
KETUA MODUL RISET 2008-2009

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



ABSTRAK

Dalam formulasi obat, pembawa obat (*drug carrier*) memegang peranan penting karena diharapkan dapat meningkatkan efektivitas obat dan keamanan. Di lain pihak, dapat menurunkan efek samping bila digunakan dalam waktu lama. Salah satu bahan pembawa obat yang sedang dikembangkan akhir-akhir ini adalah liposom. Liposom dengan formulasi EPC-TEL 2,5 yang berasal dari fosfatidilkolin kuning telur dan Tetra Eter Lipid 2,5 mol % telah terbukti menunjukkan distribusi dalam organ yang lebih baik.² Akan tetapi, stabilitas liposom tersebut secara kimia belum pernah diuji. Penelitian ini bertujuan untuk menguji stabilitas liposom EPC-TEL 2,5 yang telah disonikasi dan diberikan larutan MgCl₂ 350 mOsmol pH 7. Parameter yang dilihat adalah ukuran diameter liposom ≤ 100 nm dan >100 nm. Liposom dikatakan stabil bila ukuran diameter tidak berubah jumlahnya setelah pemaparan larutan MgCl₂ dari waktu ke waktu. Hasil dan kesimpulan yang didapatkan pada uji ini adalah jumlah liposom sonikasi tidak stabil pada diameter ≤ 100 sampai akhir penelitian. Sedangkan jumlah liposom pada diameter >100 tidak dilakukan perhitungan analisis data karena data jumlah liposom diameter >100 pada hari ke-0 tidak ada.¹⁻³

Kata kunci: liposom EPC-TEL 2,5, uji stabilitas kimia, larutan MgCL2 350 mOsmol pH 7.

ABSTRACT

Stability Test of Sonication Liposome Tetra Eter Lipid (EPC-TEL 2,5) with MgCL₂ 350 mOsmol PH 7 Exposure at 4^o Celcius. Drug delivery in drug formulation have an important role because it will increase drugs effectivity and safety. On the other side, also decrease drug's side effect if it is used for a long time. Recently, one of drug carrier products which is developed is liposome. Liposome with EPC-TEL 2,5 formulation from egg-yolk phosphatidylcholine and Tetra Eter Lipid 2,5 mol % has been proved to show better distribution in organs.² But, the stability of liposome is never tested chemically. This research main purpose is to test liposome EPC-TEL 2,5 stability after it given sonication and exposed with MgCL₂ 350 mOsmol pH 7. The object to analyze is only liposome with ≤ 100 nm and > 100 nm diameter. It will be clasified as stable if the diameter doesn't change after exposed with MgCL₂ from time to time. The result and conclusion from this test is the amounts of sonication liposome isn't stable in diameter ≤ 100 until the end of researching. While, the amounts of sonication liposome in diameter > 100 wasn't counted data analysis because there is nothing the amounts of liposome diameter >100 at the first researching.¹⁻³

Keywords: Liposome EPC-TEL 2,5, chemical stability test, MgCL₂ 350 mOsmol pH 7.

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang Masalah

Liposom merupakan partikel koloid yang terdiri dari molekul-molekul fosfolipid sebagai konstituen utama dalam pembentukan lemak lapis ganda tertutup atau *bilayer*.¹ Liposom berukuran antara 20 nm hingga 100 µm dengan ketebalan dwilapis lipid sebesar 4 nm.²⁻³ Liposom sebagai bahan pembawa obat dapat digunakan untuk membawa obat langsung ke sel target sehingga aktivitas obat terhadap sel sasaran bertambah dan efek samping obat dapat diminimalisir.⁴

Untuk aplikasi di bidang kedokteran, digunakan liposom berukuran 80-200 nm. Liposom yang berukuran 50-200 nm dapat dibuat dari berbagai komponen lipid misalnya lesitin dari kuning telur atau kedelai atau dari tetra eter lipid (TEL). TEL yang digunakan merupakan hasil destruksi membran Archaea, antara lain dari *Sulfolobus acidocaldarius* atau *Thermoplasma acidophilum*. Freisleben, dkk⁵⁻⁶ membuktikan bahwa TEL dari *Thermoplasma acidophilum* terbukti tidak toksik dan antimutagenik pada uji toksisitas akut.

Purwaningsih, dkk² mengembangkan komposisi liposom baru, yaitu liposom EPC-TEL 2,5 yang mengandung lesitin/fosfatidilkolin kuning telur (*egg-yolk phosphatidylcholine*) dan TEL (tetra eter lipid) 2,5 mol % dari *Thermoplasma acidophilum*. Dari hasil penelitian metil prednisolon yang diinkorporasi dengan liposom EPC-TEL 2,5 menunjukkan efek terapi, efek imunologik, dan distribusi dalam organ yang lebih baik dibandingkan dengan metilprednisolon tanpa inkorporasi liposom.^{2,7-9} Akan tetapi belum ada data mengenai kestabilan liposom EPC-TEL2,5. Penelitian ini dimaksudkan sebagai langkah awal dalam pengujian stabilitas liposom EPC-TEL 2,5 secara in vitro. Dengan membandingkan antara larutan liposom kontrol yang telah disonikasi dengan larutan liposom yang dipajankan dengan larutan MgCl₂ yang merupakan salah satu larutan kimia fisiologis dalam tubuh.

Tujuan penelitian untuk menguji stabilitas larutan liposom sonikasi EPC-TEL 2,5 berlabel fluorescens yang dipajankan MgCl₂ 350 mOsmol pada pH 7 yang diukur pada hari

pertama sampai bulan ke-3. Kestabilan liposom diukur di bawah mikroskop dengan menghitung jumlah liposom yang berdiameter ≤ 100 dan >100 . Liposom dikatakan stabil bila jumlah liposom yang berdiameter ≤ 100 dan >100 tidak berubah dari hari pertama sampai waktu akhir penelitian.

I.2 Rumusan Masalah

Apakah formulasi liposom EPC-TEL2,5 yang disonikasi stabil dengan pemajanan larutan $MgCl_2$ 350 mOsmol pH 7 secara *in vitro* pada suhu $4^{\circ}C$?

I.3 Hipotesis

Larutan liposom sonikasi EPC-TEL 2,5 yang dipajankan dengan $MgCl_2$ 350 mOsmol pH 7 berdiameter ≤ 100 dan >100 stabil pada suhu $4^{\circ}C$ sampai waktu akhir penelitian.

I.4 Tujuan Penelitian

I.4.1 Tujuan Umum

Penelitian ditujukan untuk menguji stabilitas liposom EPC-TEL2,5 secara kimiawi.

I.4.2 Tujuan Khusus Penelitian

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui stabilitas liposom sonikasi EPC-TEL2,5 dengan cara menghitung jumlah dan diameter ukuran partikel liposom pada kisaran osmolaritas sebesar 350 mOsmol (*in vitro*) setelah liposom terpajan larutan $MgCl_2$ (dengan pH 7) pada suhu $4^{\circ}C$.

I.5 Manfaat Penelitian

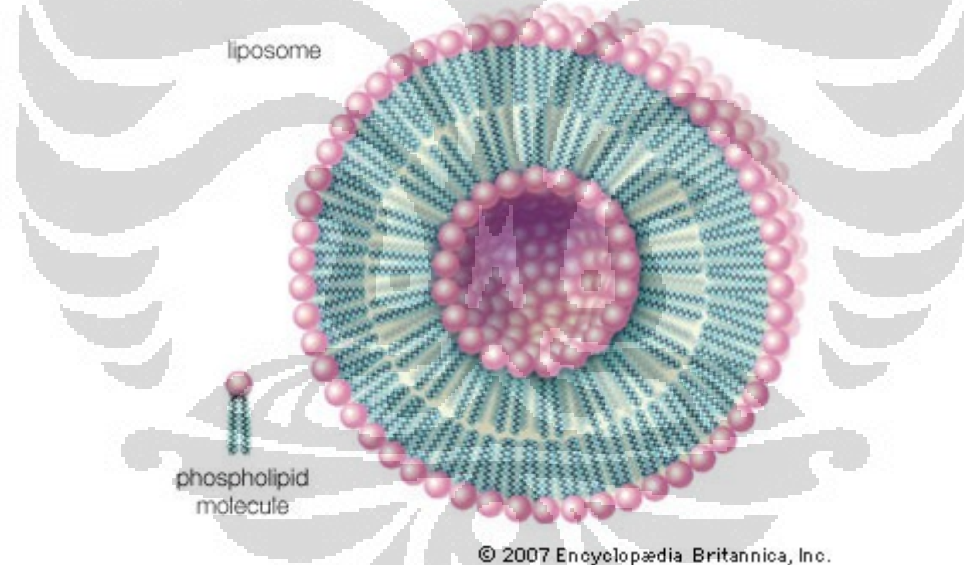
1. Bagi peneliti: untuk menambah pengetahuan di bidang riset nanoteknologi, meningkatkan kemampuan menulis serta berpikir ilmiah.
2. Bagi peneliti lain: dapat dijadikan acuan untuk melakukan penelitian selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Liposom

Liposom merupakan suatu vesikel membran yang dibentuk dengan cara mendispersikan suatu lipid, terutama fosfolipid, ke dalam media cair.¹¹⁻¹² Liposom sebagai pembawa obat telah dipatenkan pada tahun 1943 berupa campuran air antara lesitin dan kolesterol. Struktur liposom baru ditemukan pada tahun 1960 oleh Alec Bangham. 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.¹¹ Struktur liposom dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Struktur Liposom

II.1.1 Struktur Liposom

Fosfolipid merupakan komponen struktural membran biologik utama pada liposom yang terdiri atas fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin dan fosfatidilinositol.¹³⁻¹⁶ Fosfolipid yang lazim digunakan pada pembuatan liposom konvensional adalah lesitin (fosfatidilkolin) dari kuning telur (*Egg-yo* 3 *phosphatidylcholine* = EPC), jaringan otak,

Universitas Indonesia

kedelai (*Soy-bean phosphatidylcholine* = SPC) atau yang dibuat secara sintetik lipid bermuatan seperti fosfatidilserin atau fosfatidilgliserol seringkali di tambahkan sebagai stabilisator.¹⁷ Lipid yang dapat digunakan sebagai stabilisator membran liposom, yang saat ini masih belum banyak digunakan adalah tetra eter lipid (TEL) dari membran sel Archaea, yaitu antara lain *Thermoplasma acidophilum*¹⁸⁻¹⁹ dan *Sulfolobus acidocaldarius*.²²

Diameter liposom ditentukan oleh

- 1) cara pembuatan liposom²²⁻²
- 2) jenis lipid dan kombinasinya
- 3) keseimbangan antara energi untuk membuka membran liposom, elastisitas kelengkungan liposom dan jumlah energi yang tersebar

Diameter liposom berkisar antara 20 nm hingga 100 um dengan ketebalan 4 nm. Sedangkan untuk aplikasi di bidang kedokteran dibutuhkan diameter yang lebih kecil yaitu antara 80-200 nm. Penggunaan liposom sebagai pembawa obat harus memperhatikan perbandingan konsentrasi antara lipid dan obat, distribusi ukuran liposom, persentase molekul obat yang bebas yang tidak terinkorporasi pada membran liposom, PH osmolaritas, konduktivitas, adanya kemungkinan produk hasil degradasi, endotoksin dan parameter-parameter lainnya juga harus diperhatikan stabilitas baik fisik, kimia maupun biologi dan jumlah lapisan membran lipid perliposom.^{12,16,21}

II.1.2 Peranan Liposom sebagai Pembawa Obat²⁹⁻³⁷

Dari beberapa hasil penelitian, penggunaan liposom sebagai pembawa obat mempunyai beberapa keuntungan sebagai berikut :

- 1). Penyuntikan liposom-metilprednisolon (L-MPL) 2mg/kgBB, IV pada tikus jantan dewasa galur Spraque-Dawley dibandingkan dengan metilprednisolon (MPL) pada dosis yang sama menunjukkan distribusi obat di berbagai organ, 1 jam setelah penyuntikan, kadar MPL jauh lebih tinggi di limpa, timus, ginjal dan terutama di hepar, dibandingkan dengan L-MPL. Hal ini disebabkan karena kemampuan penetrasi L-MPL ke jaringan lebih lambat akibat besarnya ukuran partikel. Namun, kadar MPL cepat menurun hingga setengahnya dan tidak terdeteksi lagi setelah 6 jam, sedangkan kadar L-MPL tetap tinggi atau menurun secara perlahan-lahan dan masih terdeteksi setelah lebih dari 5 hari di limpa, timus dan hepar.²⁹ Pemberian L-MPL dengan dosis tersebut

terbukti memperpanjang waktu paruh dari 0,48 jam untuk MPL menjadi 30,13 jam untuk L-MPL, meningkatkan volume distribusi dari 2,1 menjadi 21,87 L/kg. Kadar obat dalam volume distribusi meningkat dari 339 menjadi 1093 ng/jam/mL.²⁹⁻³⁰

- 2). Waktu pemberian lebih lama dan dosis terapi lebih kecil sehingga efek samping lebih minimal. Dosis terapi efektif L-MPL pada tikus pasca transplantasi jantung hanya sebesar 2 mg/kgBB/hari dan cukup diberi 2 kali seminggu. Sebagai pembanding, untuk mendapatkan efek yang sama dari metilprednisolon saja, diperlukan dosis mg/kgBB/hari dosis 4mg/kgBB/hari, setiap hari dengan risiko, bahwa timbulnya efek samping juga meningkat.³⁰⁻³
- 3). Liposom juga berfungsi sebagai imunoajuvan yang lebih menguntungkan dibandingkan dengan ajuvan lain³³ karena:
 - a. Tidak toksik, mudah berikatan/ berinteraksi dengan bahan-bahan alami, mudah didegradasi.
 - b. Komposisi liposom dapat diubah-ubah sesuai kebutuhan, bisa bersifat tidak imunogenik atau sebaliknya.
 - c. Bila diperlukan, dapat dikombinasi dengan ajuvan lain untuk meningkatkan respon imun yang sangat kuat.
 - d. Mudah dibuat dan lebih murah dibandingkan dengan zat pembawa obat lainnya.
 - e. Dapat mengubah zat nonimunogenik menjadi imunogenik sehingga antigen yang dibutuhkan hanya dalam jumlah kecil.
 - f. Dapat berinkorporasi dengan antigen hidrofobik dan antigen multipel
 - g. Dapat menurunkan dan mengeliminasi toksisitas antigen yang bersifat toksik dan reaksi alergi terhadap protein non-toksik
 - h. Dapat mengatur sistem imun dan menginduksi imunitas
 - i. Memproduksi antibodi fungsional yang cukup tinggi sepanjang jangka waktu antibodi yang lazim.
- 4). Liposom juga sebagai zat pembawa yang ideal untuk zat yang berefek sebagai aktivator makrofag (imunomodulator) pada fase tumorisid, virosid ataupun mikrobisid yang

dapat digunakan untuk terapi pada berbagai kanker dan infeksi parasit. Salah satu imunomodulator yang tidak toksik dan digunakan sebagai pemacu respons imun adalah MDP (muramyl dipeptida, suatu fraksi terkecil dari dinding luar mikrobakteri). Kombinasi liposom MDP (L-MDP) dengan 5-fluoroasil (5-FU) atau 5-fluoro-2-deoksi uridin (FEDR) meningkatkan efek kedua antitumor tersebut. L-MDP bekerja secara sinergis dengan keduanya.³⁴ MDP juga dapat meningkatkan efisiensi enkapsulasi, bahkan dapat mengubah respon imun dari *thymus independent* menjadi *thymus dependent*. Aktivator lain yang agak toksik namun toksisitasnya berkurang apabila tersedia dalam bentuk liposom antara lain adalah interleukin 2 (IL-2) dan interferon- γ .³⁵

- 5). Liposom juga dimanfaatkan sebagai bahan pembawa terapi gen. Berbagai komposisi liposom dan modifikasinya telah diujikan agar gen yang dimaksud langsung mencapai sel sasaran.³⁶⁻³⁷
- 6). Akan tetapi, liposom dapat atau dimungkinkan menjadi antigen yang akan dirusak oleh sistem imun apabila di dalam komposisinya, terdapat sfingolipid, kardiopilin, kolesterol dalam jumlah tinggi, lebih dari 71 mol % atau lipid A (endotoksin dari suatu bakteri Gram negatif).³³ Hal ini merupakan salah satu kerugian liposom yang perlu dicermati.

II.2 *Thermoplasma acidophilum* dan Tetraeter Lipid

II.2.1 *Thermoplasma acidophilum*

Thermoplasma acidophilum (*Th.acidophilum*) merupakan *archaebacterium* asidophilik dengan pertumbuhan optimum pada suhu 59⁰C antara pH 1-2. Membran dari *Th.acidophilum* terdiri dari 3 fraksi utama: lipid apolar, glikolipid dan glikophospholipid. Struktur dasar dari lipid membran adalah sebuah *diphytanylglyceroltetraether* berasal dari dua cincin C₄₀ isoprenoid. Membran lipid ini membentuk liposom yang stabil dengan diameter minimum (150 nm).

Liposom dengan fosfolipid utama dari *Thermoplasma acidophilum* (*Th.acidophilum*) ini tidak dihancurkan oleh zat pengoksidasi dan tidak mengalami hidrolisis oleh asam lambung. Resistensi liposom dari fosfolipid utama terhadap keasaman dan impermeabilitas terhadap proton dapat melindungi kandungan yang labil melewati pH asam selama di lambung, seperti protein dan peptida. Liposom sebagai kapsul dapat memungkinkan bahan-bahan yang labil melewati rute gastrointestinal. Pada penelitian yang

Universitas Indonesia

dilakukan oleh Freisleben, dkk pada sel hidup membuktikan bahwa TEL dari *Th.acidophilum* tidak bersifat toksik dan antimutagenik.³⁸

II.2.2 Tetraeter Lipid

Tetra Eter Lipid (TEL) adalah salah satu produk hasil ekstraksi dari membran Archaea terutama yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum*¹⁸⁻¹⁹, telah teruji tidak toksik dan tidak bersifat mutagenik, baik *in vitro* maupun *in vivo*³⁸⁻³⁹. TEL yang berasal dari *Sulfolobus acidocaldarius*, walaupun sudah digunakan dalam penelitian, namun belum teruji toksisitasnya seperti *Thermoplasma acidophilum*.

Membran *Thermoplasma acidophilum* terutama terdiri atas cincin dasar tetraeter. Pada suhu tinggi, 59°C, akan terbentuk pentasiklik secara simetris di antara rantai hidrokarbon yang lebih stabil dan menurunkan derajat rotasi bebas membran karena membran menjadi tebal. Perbedaannya dengan *Sulfolobus acidocaldarius* terletak pada jenis poliol dimana poliol pada *Sulfolobus acidocaldarius* dikenal sebagai nonitol.⁴⁰

Hingga saat ini belum ada satupun bukti tentang mekanisme interaksi TEL dengan membran sel hidup. Dugaan sementara dari hasil penelitian secara *in vitro*, interaksi TEL dengan membran sel adalah secara fusi membran, pertukaran lipid antarmembran dan endositosis. Demikian pula halnya dengan degradasi TEL di dalam sel yang hingga kini belum dapat dijelaskan dengan baik karena produk standar hasil degradasi TEL belum tersedia.^{17, 40-41}

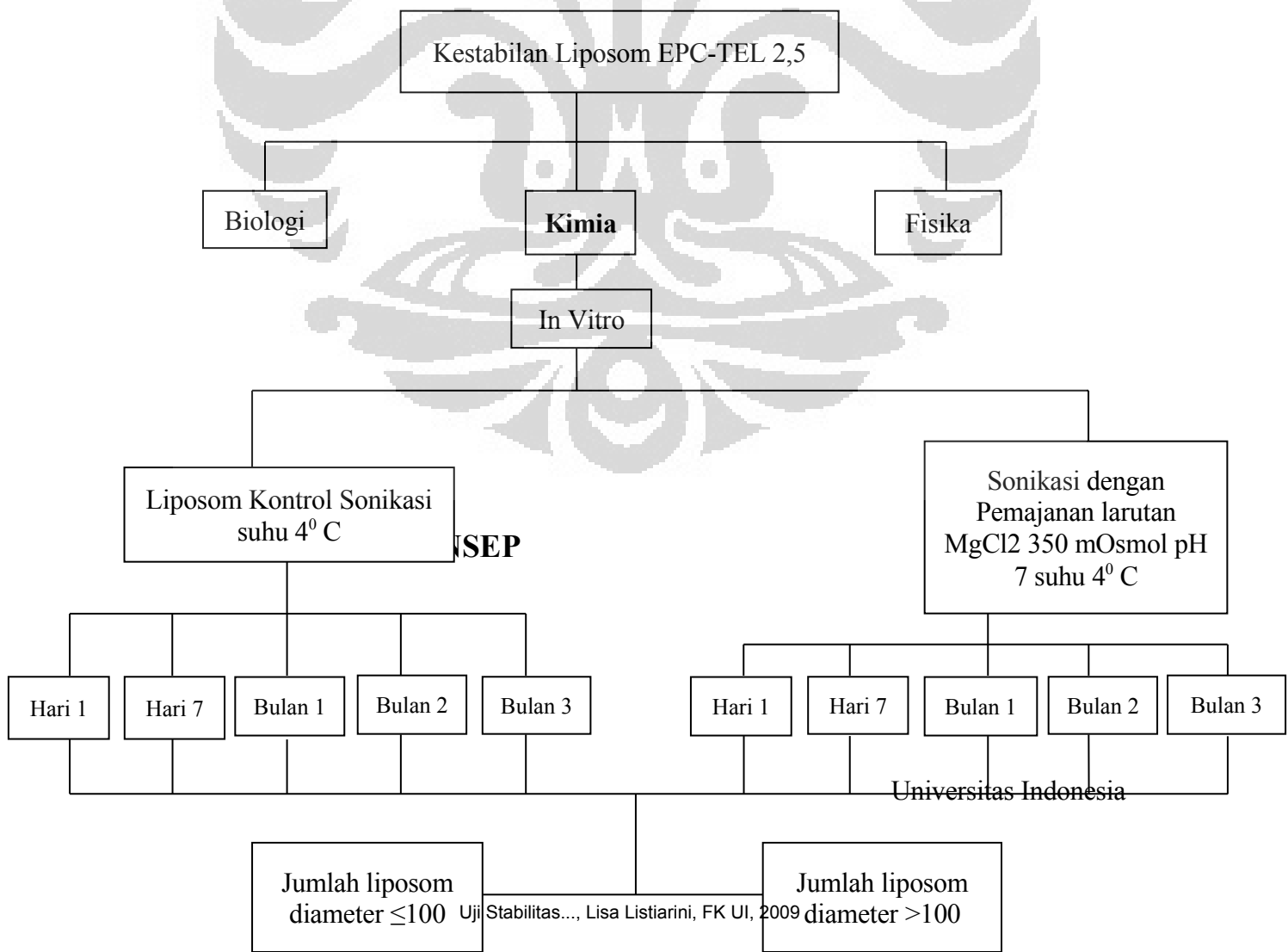
Uji stabilitas liposom yang hanya terdiri atas TEL *Thermoplasma acidophilum* saja menunjukkan bahwa TEL ini cukup stabil pada pH rendah dibandingkan pada pH netral ataupun alkalis yaitu selama 109 minggu pada suhu 4-8°C dan 10 minggu pada suhu 100°C. Kombinasi TEL dan lesitin telur dari berbagai rasio yaitu 75:25, 50:50 ataupun 25:75 menunjukkan kestabilan yang cukup tinggi hingga hari ke 622 pada suhu 4-8°C. Uji stabilitas liposom TEL diukur berdasarkan ukuran partikel dengan menggunakan *particle sizer* dan uji penglepasan karboksifluoresens dari membran liposom.⁴¹

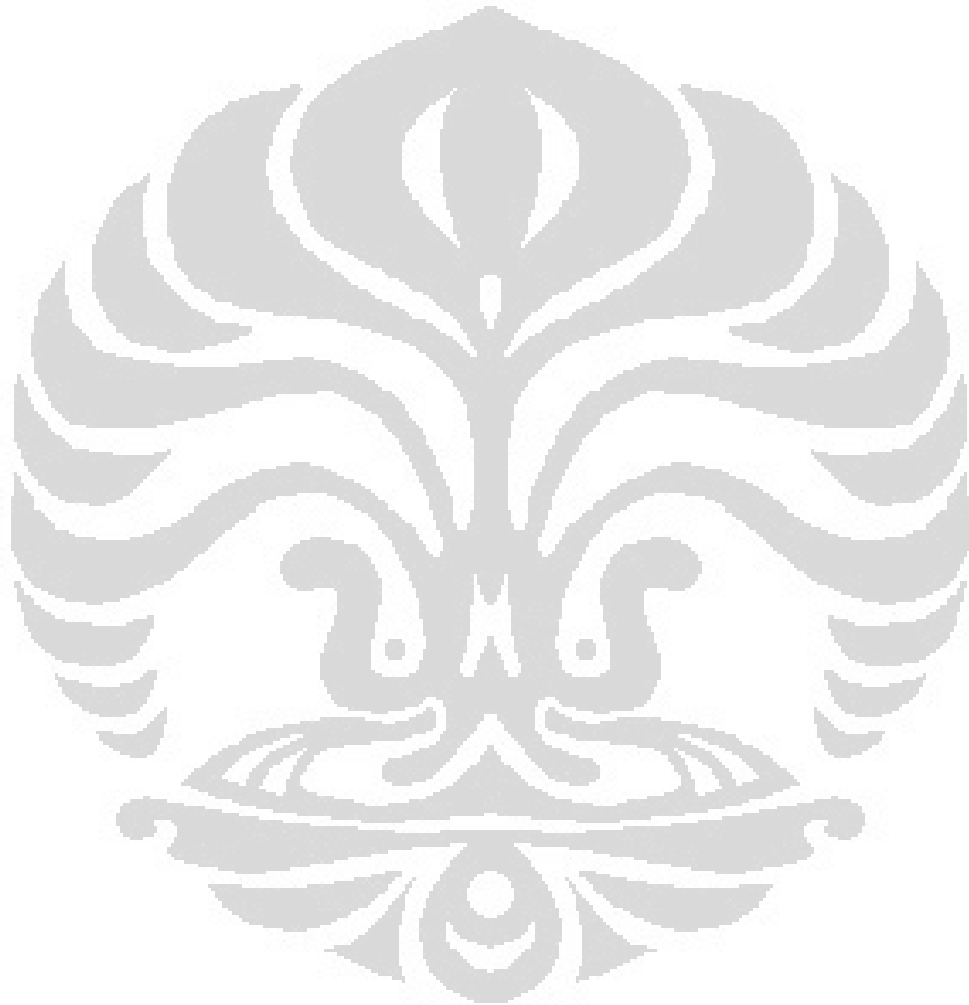
Hasil penelitian terbaru dari Patel dkk.⁴² Pada archaeosome, yaitu liposom yang terbuat dari membran Archaea lain yaitu *Methanosarcina mazei*, *Methanobacterium espanolae* dan *Thermoplasma acidophilum* menunjukkan bahwa vesikel multilamellar

(*multilamellar vesicle*=MLV) dari *Thermoplasma acidophilum in vitro* paling stabil diantara ketiga jenis Archaea.

II.3. Magnesium Klorida (MgCl₂)

Magnesium klorida merupakan molekul ionik (berikatan ion). Magnesium klorida larut dalam air menghasilkan larutan asam lemah (pH = kira-kira 6). Larutan MgCl₂ merupakan salah satu larutan kimia fisiologis dalam tubuh. Magnesium adalah kation terbanyak keempat dalam tubuh dan elektrolit intraseluler terbanyak kedua. Magnesium termasuk dalam 300 reaksi metabolisme yang penting. Magnesium dibutuhkan oleh adenosin triphosfat (ATP) dalam mensintesis protein di mitokondria. Magnesium berperan penting pada aktivitas enzimatik seluler, pembentukan tulang, dan aktivitas otot dan sel saraf.





BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan studi eksperimental untuk mengetahui kestabilan kimia larutan liposom EPC-TEL 2,5 kontrol dengan larutan liposom EPC-TEL 2,5 yang dipajankan MgCl₂ pada suhu 4°C secara *in vitro*.

III.2 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Departemen Farmasi Kedokteran dan Laboratorium Fisika Departemen Fisika Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Waktu penelitian 3 bulan yaitu bulan Februari 2007 sampai Juli 2007.

III.3 Besar Sampel:

Besar sampel penelitian ini dihitung dengan rumus Federer, dimana:

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

Keterangan:

n = jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t = jumlah kelompok perlakuan ada 10, yaitu liposom EPC-TEL 2,5 kontrol sonikasi (hari 1, hari 7, bulan 1, bulan 2, dan bulan 3) dan liposom EPC-TEL 2,5 sonikasi yang dipajankan MgCl₂ 350 mOsmol (hari 1, hari 7, bulan 1, bulan 2, dan bulan 3)

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

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

$$9n - 9 \geq 15$$

$$9n \geq 15 + 9$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 2,67$$

$$n \geq 3$$

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

III.4 Alat dan Bahan

A. Preparasi Liposom

Alat

1. Round bottom glass 1 liter yang berisi 30 beads
2. Micropipete
3. Lemari Pendingin bersuhu 4°C
4. Ekstruder Avestin
5. Kertas Parafilm
6. Aluminium foil
7. Rotavapor-Vacuum pump-Waterbath büchi
8. Es batu
9. Bath sonicator/ titanium probe sonicator Branson 1510
10. Filter PC 200 nm
11. Mikroskop
12. Kamera Panasonic WV-CP240
13. Software USB TV
14. Objek kaca
15. Penutup objek kaca

Bahan

1. 31 botol kecil
2. Etanol 70%
3. Etanol 98% sebanyak 20 ml
4. Aquabidest
5. Aquadest
6. Liposom EPC sebanyak 78 mg
7. TEL 2,5% sebanyak 124 µl
8. Quinacrine sebanyak 50 ml

9. Kloroform 98% sebanyak 20 ml

B. Preparasi Penimbangan Liposom *Egg-yolk phosphatidylcholine* (EPC), TEL, dan Quinacrine

1. EPC

Diketahui : Mr Liposom EPC = 780 gram
 1 ml air = 10 mMolar liposom EPC
 1 orang membutuhkan 10 ml larutan liposom

Dicari : Massa liposom

$$\begin{aligned} M &= \frac{n}{V} \\ &= \frac{\text{gr} / \text{Mr}}{V} \\ 10 \text{ mM} &= \frac{\text{gr} / 780}{10 \text{ ml}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Gr (massa liposom)} &= 10 \cdot 10^{-3} \cdot 780 \cdot 10 \cdot 10^{-3} \\ &= 78 \cdot 10^{-3} \text{ gr} \\ &= 78 \text{ mg / orang} \end{aligned}$$

Untuk 5 orang = 78 mg x 5 = 390 mg

2. TEL

Diketahui : TEL → 2,5 % dari mol EPC
 Mr TEL = 1488,4

Dicari :
 massa TEL
 Mol TEL dalam 10 ml air = $\frac{2,5}{100} \times 100 \text{ mMolar} = 2,5 \text{ mmol TEL}$
 Massa TEL = Mr x mol
 = 1488,4 x 2,5 = 3,721 / org
 = 18,625 / 5 org

EPC + TEL dilarutkan menjadi 50 ml liposom

TEL yang tersedia = 150 mg/ml

Dalam 1 ml larutan terdapat 150 mg TEL

Volume TEL yang dibutuhkan :

$$18,6 \times 1 \text{ ml} = 0,124 \text{ ml}$$

150

Dengan Sduit :

1 ml = 80 IU

0,124 ml TEL = 9,92 IU

= 10 IU

3. Quinacrine

Diketahui : $\frac{2,5 \text{ mg Quinacrine}}{50 \text{ g lipid}} = 0,005\%$

Berarti $\frac{0,005 \text{ gr}}{100 \text{ cc larutan}} = 0,005\% \text{ Quinacrine dalam larutan}$

Dicari : massa Quinacrine

Lipid = EPC + TEL

= 390 + 18,625 = 408,625 mg lipid dalam 50 ml liposom

Massa Quinacrine = $\frac{0,005}{100} \times 408,625 \text{ mg} = 0,020 \text{ mg}$

= 2×10^{-5} gram

Quinacrine yang dilarutkan dalam buffer 5 cc

0,005% → kalau 10 cc → 0,0005 gram = 0,5 mg

Hasil pengenceran 5 x → dalam 50 cc dibutuhkan 0,5 mg

Dalam 5 cc buffer → $0,5 \times \frac{5}{50} = 0,05 \text{ mg}$

Volume Quinacrine :

$\frac{0,020 \text{ mg} \times 1000 \mu\text{L}}{50 \text{ ml}} = 0,4 \mu\text{L}$ larutan Quinacrine untuk 50 ml sediaan liposom

Untuk 40 preparat : $\frac{0,4}{40} = 0,01 \mu\text{L}$

Diencerkan 10 x = 0,1 μL

C. Pembuatan Liposom Kontrol

1. Semua alat yang akan digunakan dicuci dengan etanol 70%, kemudian dengan Aquadest kemudian dicuci lagi dengan etanol 98% untuk menghilangkan lemak. Setelah itu dikeringkan.

Universitas Indonesia

2. Rotavapor-Vacuum pump-Waterbath büchi dipanaskan
3. Air dimasukkan ke dalam Waterbath büchi sampai seperempat bagian dari Round bottom glass terendam
4. Panaskan air dengan suhu mencapai 40°C
5. Dilakukan penimbangan liposom EPC dan TEL, kemudian campurkan kedua bahan tersebut
6. Dua puluh mililiter etanol 98% dicampurkan dengan 20 ml kloroform. Lalu ambil dan masukkan 1 ml campuran tersebut ke dalam EPC dan TEL untuk melarutkan.
7. Kemudian tuang ke dalam Round bottom glass.
8. Lakukan berulang kali sampai tidak terlihat minyak (campuran EPC dan TEL terlarut).
9. Kemudian tuang sisa campuran kloroform dan etanol ke dalam Round bottom glass dan Round bottom glass dipasang ke Rotavapor-Vacuum pump-Waterbath büchi
10. Tombol pemutar dihidupkan
11. Mesin vakum dihidupkan, atur perlahan hingga tekanan mencapai 200 milibar
12. Mesin pendingin dihidupkan
13. Tunggu sampai larutan di dalam Round bottom glass terevaporasi dan timbul lapisan tipis.
14. Kemudian turunkan tekanan secara perlahan sampai <50 milibar
15. Proses pembuatan dihentikan bila sudah tidak tercium lagi aroma campuran kloroform dan etanol dalam Round bottom glass
16. Encerkan lapisan tipis pada nomor 13 dengan 50 ml Aquabidest didapatkan larutan liposom kontrol dan dikocok selama 15 menit.

D. Pembuatan Liposom Sonikasi Kontrol

1. Wadah yang berisi liposom kontrol diletakkan ke dalam Bath Sonicator
2. Kemudian air dimasukkan ke dalam Bath Sonicator sampai berada pada setengah dari wadah liposom kontrol
3. Setelah itu pasang *timer* pada menit ke-60 dan nyalakan mesin sonicatornya
4. Setelah sampai pada menit ke-60, mesin akan berhenti. Didapatkan larutan liposom sonikasi kontrol.

5. Buat larutan Quinacrine dan suntikkan ke dalam masing-masing larutan liposom dengan Quinacrine sebanyak 10 μ l dengan micropipete.
6. Ambil 20 μ l dengan micropipete, tuang ke atas gelas objek kaca yang sudah mempunyai ukuran. Periksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 40×10 .
7. Hitung jumlah liposom per 10 lapang pandang. Hitung ukuran liposom dalam 10 lapang pandang. Rekam, foto, dan catat hasilnya.
8. Ulangi langkah ke 6 dan 7 pada hari ke 1, hari 7, bulan 1, bulan 2, dan bulan 3.

E. Pembuatan Liposom Sonikasi yang Terpapar $MgCl_2$ 350 mOsmol pH 7

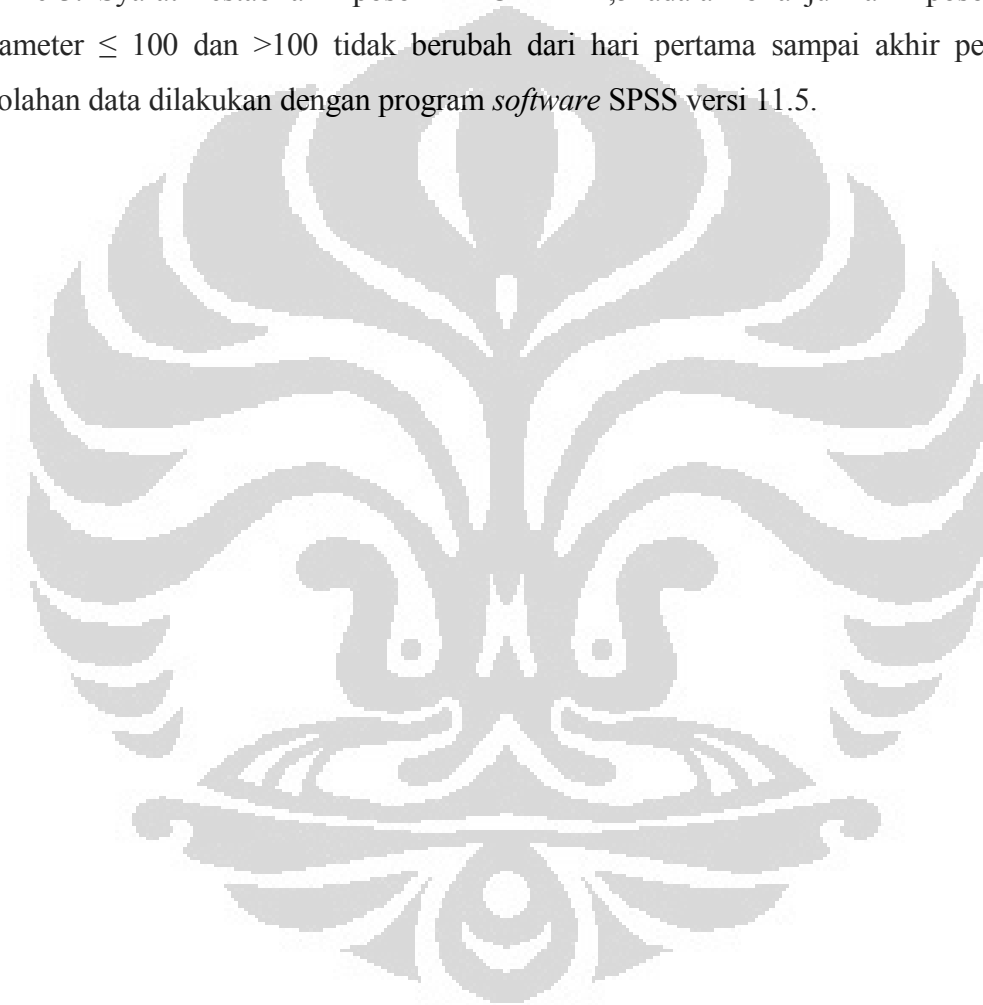
1. Wadah yang berisi liposom kontrol diletakkan ke dalam Bath Sonicator
2. Kemudian air dimasukkan ke dalam Bath Sonicator sampai berada pada setengah dari wadah liposom kontrol
3. Setelah itu pasang *timer* pada menit ke-60 dan nyalakan mesin sonicatornya
4. Setelah sampai pada menit ke-60, mesin akan berhenti. Didapatkan larutan liposom sonikasi kontrol.
5. Tambahkan larutan $MgCl_2$ 350 mOsmol pH 7 dengan jumlah larutan yang sama banyaknya.
6. Buat larutan Quinacrine dan suntikkan ke dalam masing-masing larutan liposom dengan Quinacrine sebanyak 10 μ l dengan micropipete.
7. Ambil 20 μ l dengan micropipete, tuang ke atas gelas objek kaca yang sudah mempunyai ukuran. Periksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 40×10 .
8. Hitung jumlah liposom per 10 lapang pandang. Hitung ukuran liposom dalam 10 lapang pandang. Rekam, foto, dan catat hasilnya.
9. Ulangi langkah ke 6 dan 7 pada hari ke 1, hari 7, bulan 1, bulan 2, dan bulan 3.

III.5 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan uji komparatif Kruskal-Wallis. Dasar penggunaan uji Kruskal-Wallis pada penelitian ini adalah variabel yang diuji bersifat kategorikal, data terdiri dari 10 kelompok, dan kelompok data tidak berpasangan. Metode Kruskal-Wallis digunakan untuk menguji kestabilan liposom kontrol sonikasi dengan liposom sonikasi yang terpapar dengan larutan $MgCl_2$ 350 mOsmol dengan pH 7 suhu $4^{\circ}C$

pada hari 1, hari 7, bulan 1, bulan 2, bulan 3. Kestabilan diukur dengan menghitung jumlah liposom yang berdiameter ≤ 100 dan diameter >100 .

Pengamatan liposom pada hari ke-1 merupakan kontrol untuk menentukan jumlah liposom hari selanjutnya. Hasil pengamatan liposom kontrol hari ke-1, hari ke-7, bulan ke-1, bulan ke-2, dan bulan ke-3 dibandingkan dengan hasil pengamatan liposom yang dipajankan MgCl_2 350 mOsmol pH 7 hari ke-1, hari ke-7, bulan ke-1, bulan ke-2, dan bulan ke-3. Syarat kestabilan liposom EPC-TEL 2,5 adalah bila jumlah liposom yang berdiameter ≤ 100 dan >100 tidak berubah dari hari pertama sampai akhir penelitian. Pengolahan data dilakukan dengan program *software* SPSS versi 11.5.



BAB IV

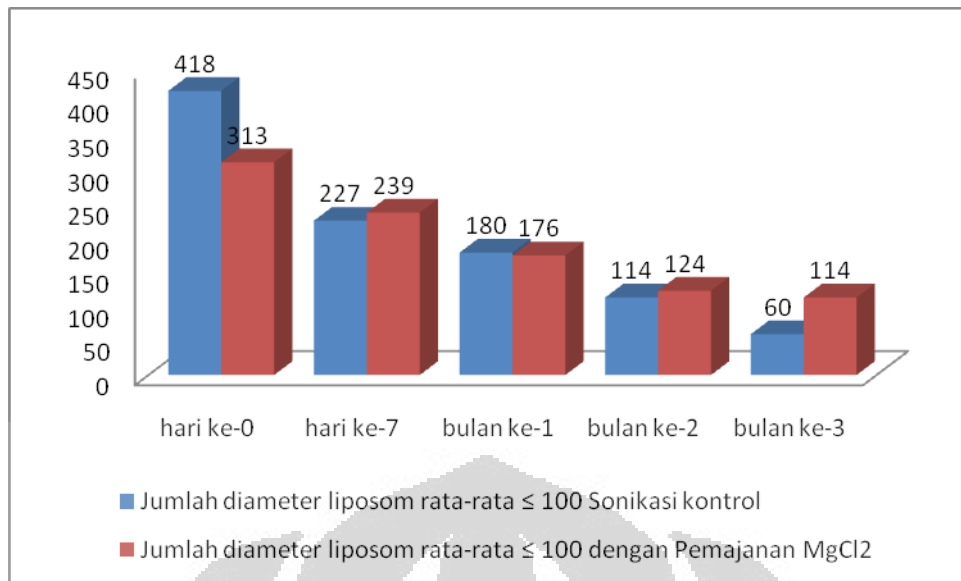
HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil

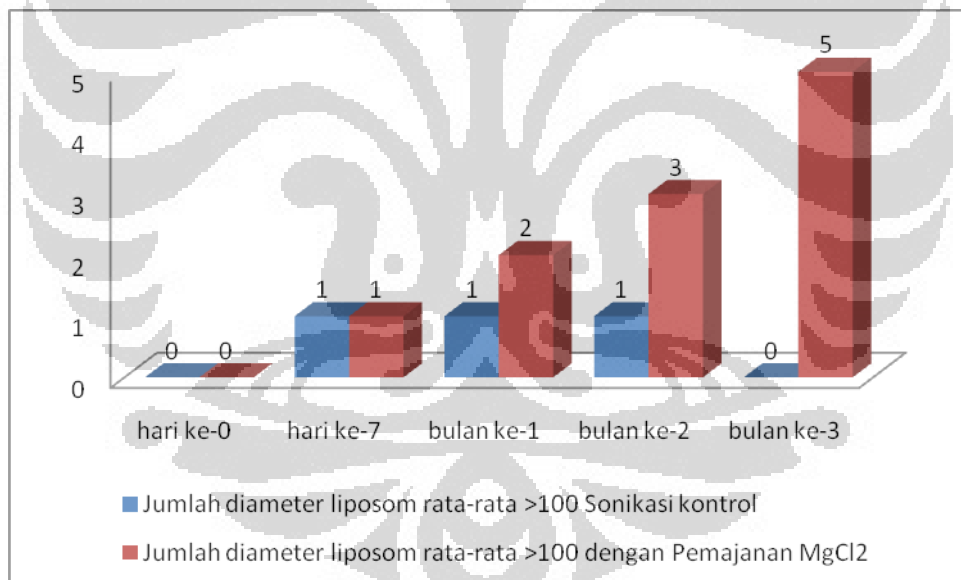
Setelah penghitungan dan pengukuran di bawah mikroskop, maka didapatkan hasil dengan rincian pada tabel 1 di bawah ini:

Tabel 1. Hasil Perhitungan Jumlah Liposom

Waktu Pengukuran	Hasil Pengamatan	Liposom Sonikasi Kontrol		Liposom Sonikasi dengan pemajanan MgCl ₂ 350 mOsmol pH 7	
		diameter ≤ 100	diameter >100	diameter ≤ 100	diameter >100
Hari 1	Data I	437	0	308	0
	Data II	408	0	252	0
	Data III	410	0	378	0
Hari 7	Data I	220	0	234	0
	Data II	274	0	206	0
	Data III	188	2	277	2
Bulan 1	Data I	182	2	183	1
	Data II	170	0	150	0
	Data III	189	0	196	4
Bulan 2	Data I	142	3	179	2
	Data II	89	1	74	8
	Data III	110	1	118	0
Bulan 3	Data I	62	1	150	3
	Data II	60	0	84	9
	Data III	58	0	107	3



Gambar 2. Grafik Jumlah rata-rata Liposom ≤ 100 nm

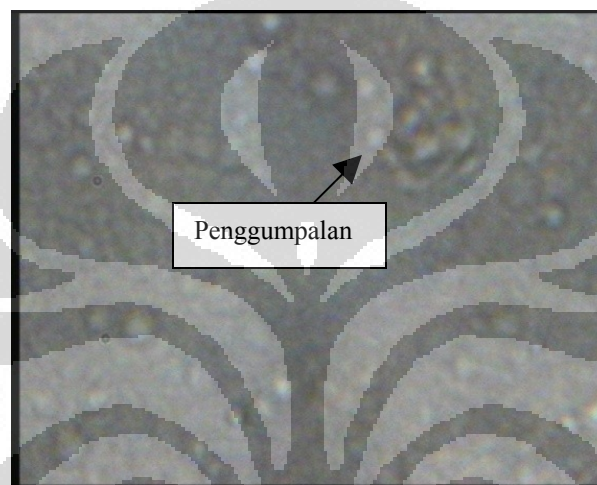


Gambar 3. Grafik Jumlah rata-rata Liposom > 100 nm

IV.2 Pembahasan

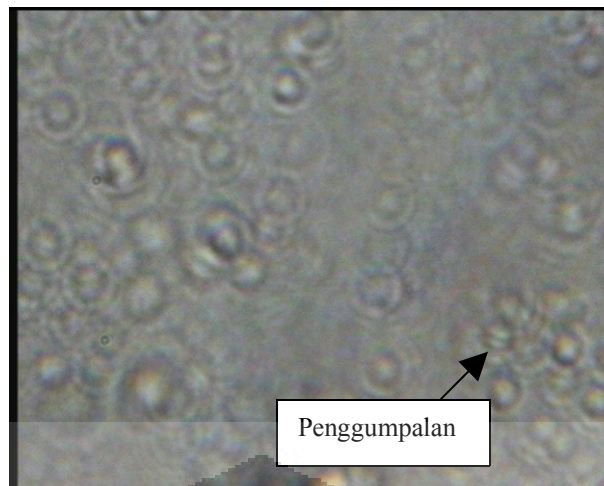
Data liposom berdiameter ≤ 100

Dari tabel 1 dan gambar 2, jumlah liposom sonikasi kontrol menunjukkan penurunan jumlah pada hari ke-0 sampai bulan ke-3. Sebaliknya, pada gambar 4 terdapat peningkatan penggumpalan atau fusi yang dimulai dari hari ke-7 sampai bulan ke-3. Dapat disimpulkan, jumlah penurunan jumlah pada liposom sonikasi kontrol kemungkinan dapat disebabkan oleh fusi dari liposom-liposom tersebut yang menandakan ketidakstabilan.



Gambar 4. Liposom Sonikasi Kontrol hari ke-7

Pada pengamatan data liposom sonikasi yang dipajankan $MgCl_2$ dari tabel 1 dan gambar 2 didapatkan penurunan jumlah pada hari ke-0 sampai bulan ke-3. Pada gambar 5, terdapat peningkatan penggumpalan atau fusi yang dimulai pada bulan ke-1 sampai bulan ke-3 yang menunjukkan ketidakstabilan.



Gambar 5. Liposom Sonikasi yang dipajankan MgCl₂ bulan ke-1

Kestabilan data liposom yang diuji dengan metode Kruskal Wallis didapatkan $p=0,002$. Karena $p < 0,05$, hal ini menandakan jumlah liposom dari hari 1, hari 7, bulan 1, bulan 2, dan bulan 3 berbeda bermakna. Maka dapat disimpulkan data liposom berdiameter ≤ 100 tidak stabil sampai akhir penelitian sehingga hipotesis ditolak. Karena tidak stabil, maka dilakukan uji multiple comparison *post Hoc* untuk mengetahui waktu data liposom yang tidak stabil. Pada liposom kontrol sonikasi ketidakstabilan dimulai pada hari ke-7. Sedangkan, pada liposom yang dipajankan MgCl₂, ketidakstabilan dimulai pada bulan ke-1.

Ketidakstabilan liposom ini kemungkinan disebabkan oleh faktor-faktor di bawah ini. Pertama, dipengaruhi oleh waktu sehingga makin lama penyimpanan semakin meningkatkan ketidakstabilan liposom oleh karena terjadi penggabungan liposom sehingga membuat jumlah liposom berubah. Kedua, perubahan suhu saat pemindahan sampel liposom ke objek glass dan saat melakukan penghitungan liposom di bawah mikroskop. Ketiga, penambahan larutan MgCl₂ yang konsentrasinya cukup tinggi sehingga membuat perubahan bermakna dalam jumlah dan diameter liposom. Keempat, kesalahan perhitungan jumlah liposom secara manual karena keterbatasan mata.

Data liposom berdiameter > 100

Pada tabel 1 dan gambar 3, jumlah liposom sonikasi kontrol pada hari ke-0 adalah 0 (tidak ada). Pada hari ke-7 sampai bulan ke-2, jumlah liposom sonikasi kontrol naik dengan jumlah rata-rata 1. Sedangkan pada bulan ke-3 jumlah liposom sonikasi kontrol turun menjadi 0. Peningkatan jumlah liposom sonikasi kontrol pada hari-7 sampai bulan ke-2 kemungkinan dapat disebabkan fusi atau penggabungan liposom ≤ 100 . Sedangkan jumlah liposom sonikasi kontrol yang turun pada bulan ke-3 dapat disebabkan pecahnya fusi tersebut. Pada pengamatan liposom dengan pemajanan MgCl₂ pada hari ke-0 adalah 0. Pada hari ke-7 sampai bulan ke-3 didapatkan peningkatan jumlah liposom. Hal ini kemungkinan dapat disebabkan fusi atau penggabungan liposom ≤ 100 . Oleh karena data jumlah liposom pada hari ke-0 tidak ada maka tidak dilakukan perhitungan analisis data dengan uji Kruskal-Wallis.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai “Uji Stabilitas Liposom Sonikasi EPC-TEL 2,5 Kontrol dengan yang Dipajankan MgCl₂ 350 Mosmol PH 7 pada Suhu 4⁰ Celcius” seperti yang telah diuraikan pada bab IV, dapat disimpulkan bahwa jumlah liposom sonikasi EPC-TEL 2,5 kontrol dan yang dipajankan MgCl₂ 350 mOsmol pH 7 tidak stabil pada diameter ≤ 100 pada pengamatan dan penghitungan statistik analitik. Sedangkan jumlah liposom pada diameter > 100 tidak dilakukan perhitungan analisis data karena data jumlah liposom diameter >100 pada hari ke-0 tidak ada.

V.2 Saran

Pada penelitian terhadap liposom EPC-TEL 2,5 perlu dikembangkan metode yang lebih akurat dalam menghitung jumlah dan pengukuran diameter liposom karena keterbatasan mata menjadi kendala dalam perhitungan liposom. Selain itu diperlukan penelitian untuk mengetahui kestabilan liposom secara fisika dan biologi untuk menunjang dunia kesehatan.

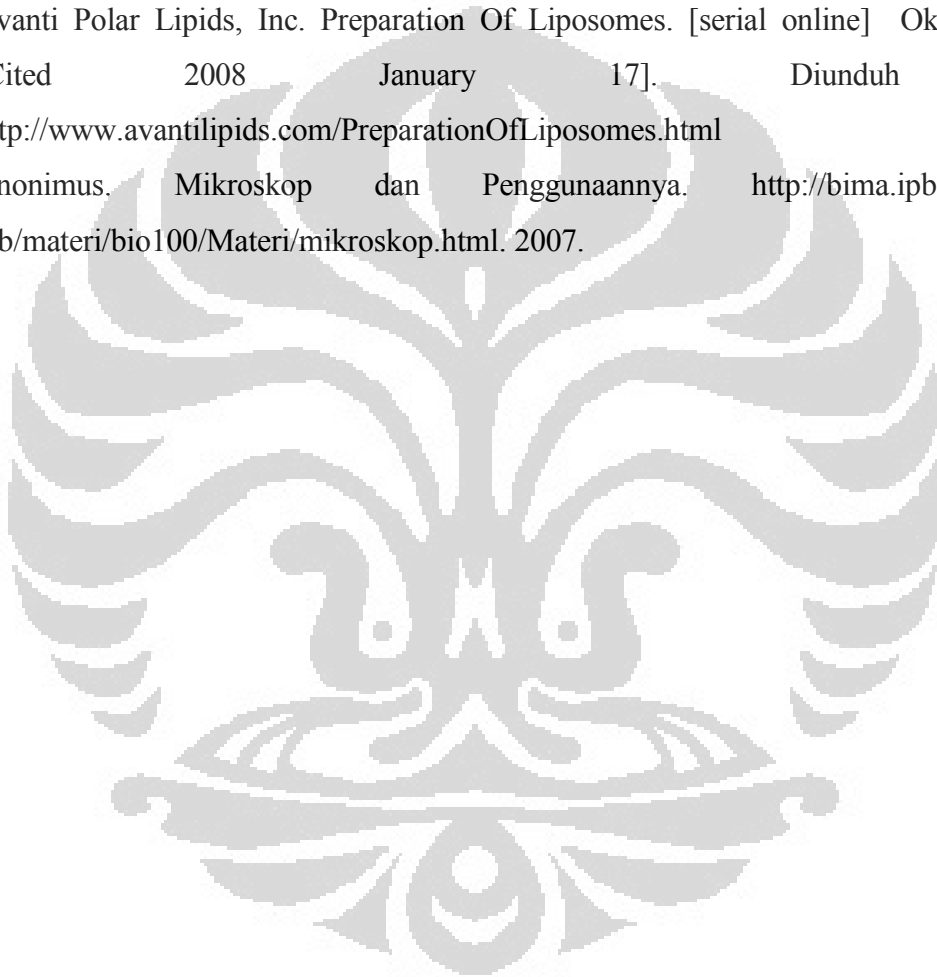
DAFTAR PUSTAKA

1. Jufri M. Arah dan Perkembangan *Liposome Drugs Delivery Systems*. Majalah Ilmu Kefarmasian 2004; 1(2): 59 – 68.
2. 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.
3. Ringoringo VS. Sistem Penyampaian Obat Terkontrol. Cermin Dunia Kedokteran no. 32. Pusat Penelitian dan Perkembangan PT Kalbe Farma; 1984.
4. Mishina EV, Straubinger RM, Pszycynski NA, Jusko WJ. Enhancement of tissue delivery and receptor occupancy of methylprednisolon in rats by liposomes formulation. *J pharmacy Res* 1993; 10(10): 1402-9.
5. HandsFreise CE, Liu T, Hong K, et al. the increased efficacy and decreased nephrotoxicity of cyclosporin liposome. *Transplantation* 1994;579 (6): 928-32.
6. 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.
7. Effendi AR. Efek Liposom metilprednisolon palmitat terhadap kadar TNF α dan distribusinya di hepar dan limpa mencit. Tesis Program Studi Ilmu Biomedik FKUI, Program pascasarjana UI, November 2002.
8. Wawaimuli Arozal, FD Suyatna. Ernie H Purwaningsih, Hedi R Dewoto. Peningkatan Efek Antiinflamasi Sediaan Metilprednisolon dalam bentuk Liposom. *MKI* 2005; 56(1): 17-22.
9. Nina Marliana Efek Liposom Metilprednisolon Palmitat terhadap Proliferasi Limfosit CD4+ dan CD8+ yang distimulasi oleh Concanavalin A secara in vitro. Tesis Program Studi Ilmu Biomedik FKUI, Program Pascasarjana UI, januari 2004.
10. Lasic DD (ed). *Liposomes as drug delivery system Liposomes from Physics ti Application*. Elsevier Science publisher BV.1993.p.265-324.
11. Lasic DD. *Liposomes Science and Medicine* 1996 (may-June): 34-43.
12. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson D9eds). *The plasma membrane. The lipid bilayer in: Molecular Biology of the cell*. Garland publish. Inc. 1983:255-317.

13. Zubay GL(ed). Lipids and membranes. In : Biochemistry. 4th ed. Wm. C. Brown Publisher.1998:443-61.
14. Karp G(ed). The structure and function of the plasma membrane. In : Cell and molecular Biology; Concept and Experiment.2nd ed. John Wiley& Sons Inc.1999: 128-130.
15. New RRC (ed). Introduction. In Liposomes. A practical Approach. IRL Press 1990 : 1-31
16. Lasic DD(ed) . chemistry of Lipids and Liposomes. In : Liposomes from Physics to Application. Elsevier Science Publisher BV 1993: 1-42.
17. Stern J, Freisleben HJ, Janku S, Ring K. Black lipid membrane of tetraether lipids from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim Biophys Acta* 1992;1128:227-36.
18. Freisleben HJ, Henkel L, Gutermann R, Rudolph P, John G, Sternberg B, Winter S, Ring K. Fermentor cultivation of *Thermoplasma acidophilum* for the production of cell mass and the main of phospholipids fraction. *Appl Microbiol Biotech* 1994;40:745-52.
19. 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.
20. New RRC. Characterization of liposomes. In : New RRC (ed). Liposomes. A. Practical approach. IRL Press 1991 : 105-61.
21. New RRC. Preparation of liposomes. In: New RRC(ed). *Liposomes. A Practical approach*. IRL Press 1991; 33-104.
22. Lasic DD(ed). Preparation of liposomes.in: *Liposomes from physics to Application*. Elsevier Publisher BV 1993:63-107.
23. Mishina EV, Jusko WJ. Selected tissue distribution of liposomal methylprednisolone in rats. *Res Commun chem. Pathol Pharmacol* 1994b;84:47-52.
24. 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.
25. Binder J, Mishina EV, Jusko WJ, Kupiec- Weglinski JW. Prolongation of cardiac allograft survival in rats by liposome- encapsulated methyl- prednisolone. *Transplantation* 1994; 58 (5) : 633-5.
26. Mishina EV, Jusko WJ. Liposomal methyl-prednisolon in rats: dose-proportionality and chronic –dose pharmacokinetics/pharmacodynamic. *Pharm Res* 1996: 13 (1) : 141-5

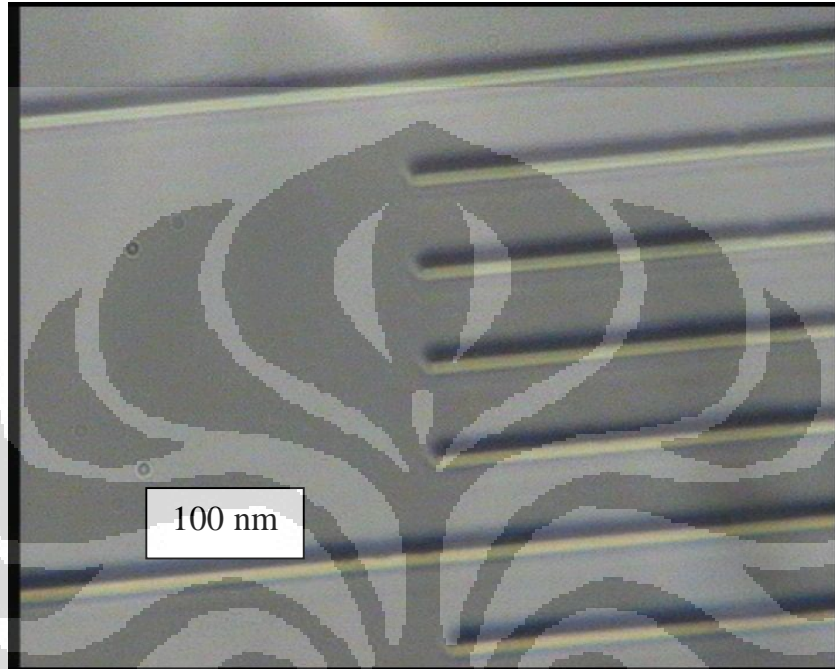
- (abstract).
27. Lasic DD(ed). Liposomes in the treatment of infectious diseases. In *liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993:323-48.
 28. Bakker-Woudenberg IAJM. Liposomes in the treatment of parasitic, viral, fungal, and bacterial infections. *J Liposomes Research* 1995;5(1):169-91
 29. Lasic DD. Liposomes as immuno-adjuvants. In: *Liposomes from physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993 : 347-64.
 30. Daemen T, Regts J, Morselt H, Scherphof GL. The effect of liver macrophages on colon carcinoma cells : evidence of macrophage activation. *Int J Immunopharmac* 1992;14(5): 857-64.
 31. Garcon NM, Six HR. Universal vaccine carrier. Liposomes that provide Tdependent help to weak antigens. *J Immunol* 1991; 146(11): 3697-3702.
 32. Dickson D. UK scientist test liposome gene therapy technique. *Nature* 1993, 365:4.
 33. Matsui H, Johnson LG, Randell SH, Boucher RC. Loss of binding and entry of liposome DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272(2): 1117-26.
 34. Freisleben HJ, Neisser C, Hartmann M, Rudolph P, Geck P, Ring K, Muller WEG. Influence of the main phospholipids (MPL) from *Thermoplasma acidophilum* and of liposomes from MPL on living cells: cytotoxicity and mutagenicity. *J Liposome Research* 1993;3(3):817-33.
 35. Freisleben HJ, Bormann J, Litzinger DC, Lehr F, Rudolph P, Schatton W, Huang L. Toxicity and biodistribution of liposomes of the main phospholipids from the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum* in mice. *J Liposome Research* 1995;5(1):215-23.
 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. The main phospholipids of the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. Does the Liposome Technology with this unique Tetraether Lipid provide novel perspectives for Biochemistry and Medicine? (Title translated from German to English). Habilitation at Johann-Wolfgang, Goethe University, Frankfurt am Main, 1992.

38. Patel GB, Agnew BJ, Deschatelets L, Fleming LP, Sprott GD. In vitro assessment of archaesome stability for developing oral delivery systems. *Int J Pharmac* 2000;194:39-49.
39. Nelson WE, Behrman RE, Kliegman R, Arvin AM. Ilmu Kesehatan Anak Volume 1. Wahab AS (editor). Edisi ke-15. Jakarta: EGC; 2000.h. 247-9.
40. Robert C. MacDonald, Ruby I. MacDonald, Bert Ph.M. Menco, Keizo Takeshita, Nanda K. Subbarao, Lan-rong Hu. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. 1990; 297-303.
41. Avanti Polar Lipids, Inc. Preparation Of Liposomes. [serial online] Oktober 1997 [Cited 2008 January 17]. Diunduh dari <http://www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes.html>
42. Anonimus. Mikroskop dan Penggunaannya. <http://bima.ipb.ac.id/~tpb-ipb/materi/bio100/Materi/mikroskop.html>. 2007.



LAMPIRAN 1

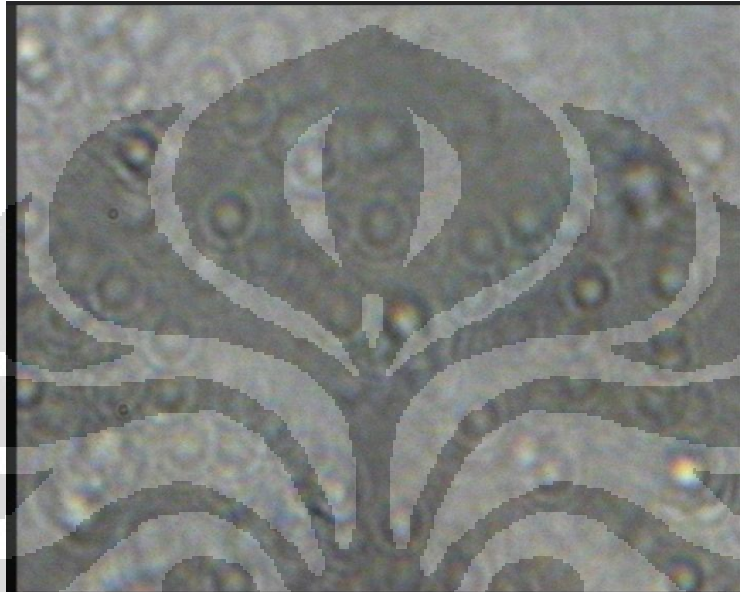
FOTO SKALA UKUR



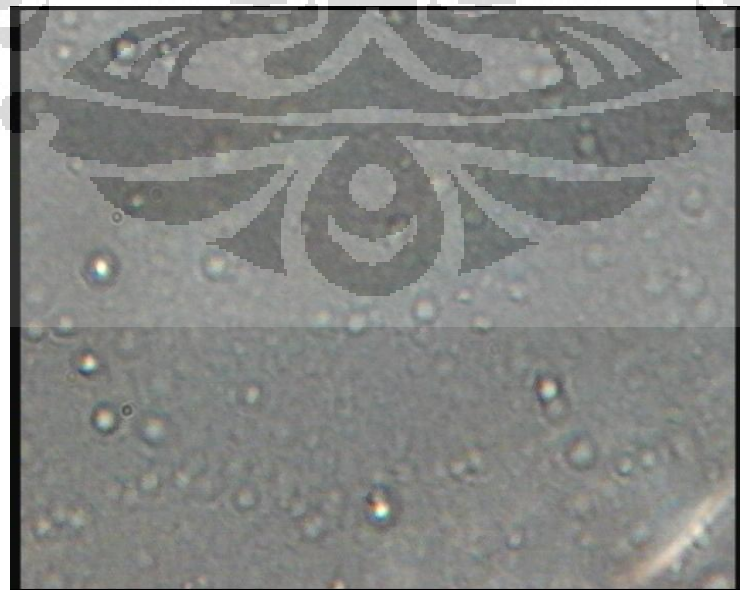
LAMPIRAN 2

AMGAMATAN HARI 1, HARI 7, BULAN 1, BULAN 2, BULAN 3

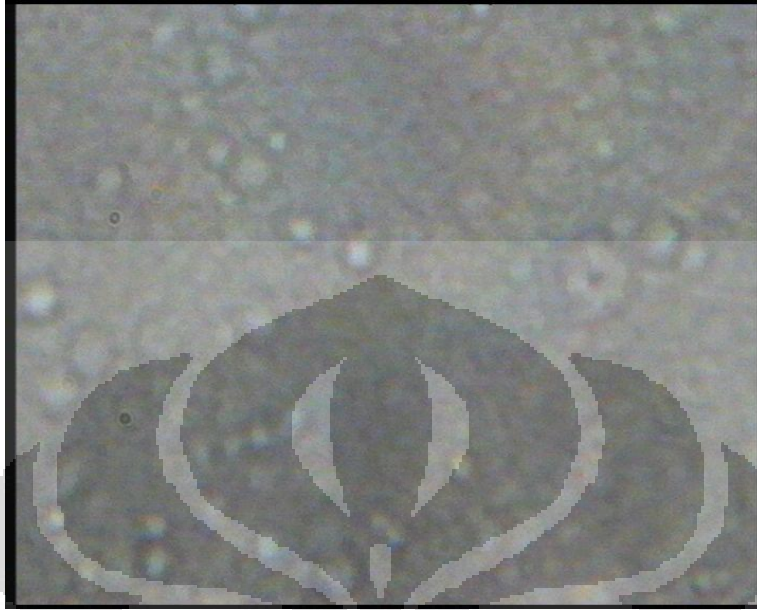
Foto Liposom Hari-1



Liposom EPC-TEL 2,5 Kontrol Sonikasi



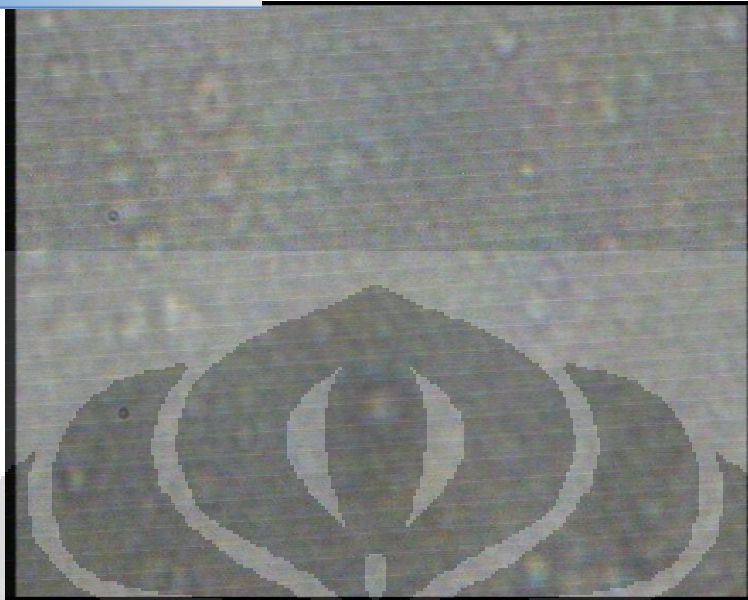
Liposom EPC-TEL 2,5 sonikasi yang dipaparkan larutan MgCL₂ 350 mOsmol pH 7



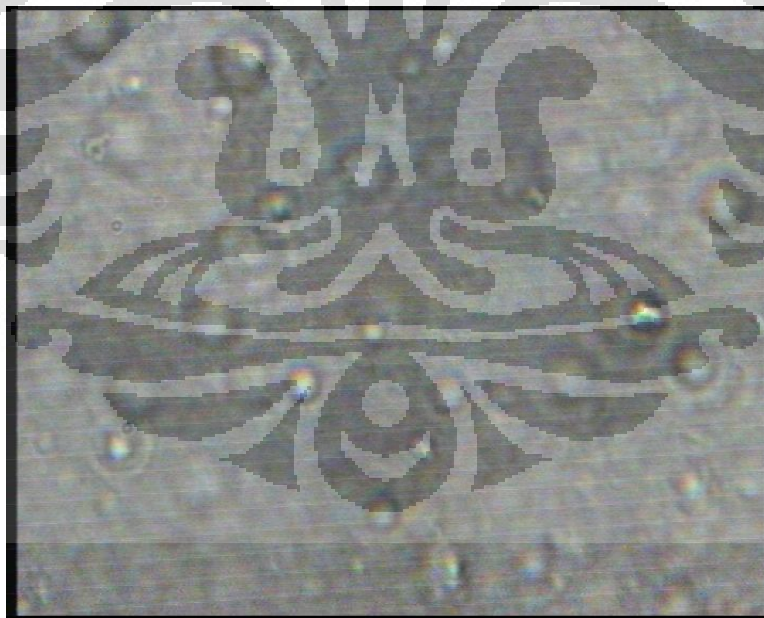
Liposom EPC-TEL 2,5 Kontrol Sonikasi



Liposom EPC-TEL 2,5 sonikasi yang dipaparkan larutan MgCL₂ 350 mOsmol pH 7



Liposom EPC-TEL 2,5 Kontrol Sonikasi



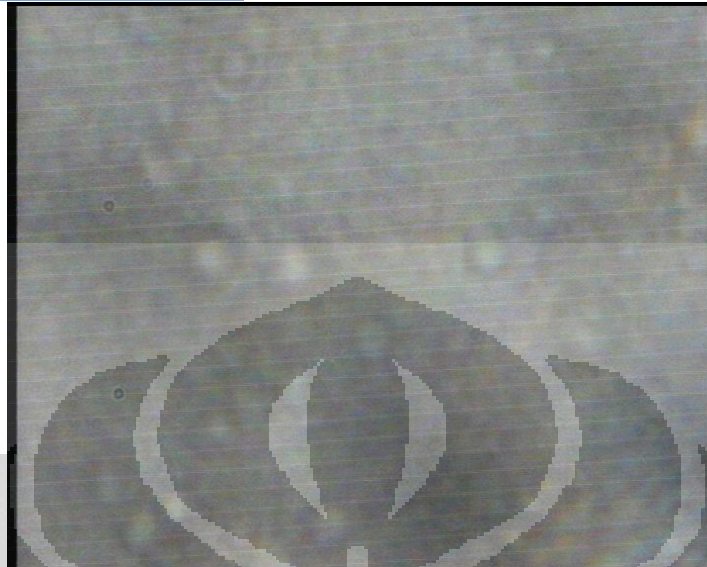
Liposom EPC-TEL 2,5 sonikasi yang dipaparkan larutan MgCL2 350 mOsmol pH 7



Liposom EPC-TEL 2,5 Kontrol Sonikasi



Liposom EPC-TEL 2,5 sonikasi yang dipaparkan larutan MgCL₂ 350 mOsmol pH 7



Liposom EPC-TEL 2,5 Kontrol Sonikasi



Liposom EPC-TEL 2,5 sonikasi yang dipaparkan larutan MgCL₂ 350 mOsmol pH 7

LAMPIRAN 3

DAFTAR RANGKAIAN MENGGUNAKAN PROGRAM SPSS ver.

11.5

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	
Jumlah liposom yang berdiameter kurang dari sama dengan 100	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 0	3	29.00	
	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 7	3	20.67	
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 1	3	15.33	
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 2	3	8.00	
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 3	3	2.00	
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 0	3	25.33	
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 7	3	22.33	
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 1	3	15.50	
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 2	3	9.00	
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 3	3	7.83	
	Total	30		
	Jumlah liposom yang berdiameter lebih dari 100	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 0	3	8.50
		Liposom Kontrol Sonikasi Hari 7	3	13.17
Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 1		3	13.17	
Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 2		3	21.00	
Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 3		3	11.83	
Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 0		3	8.50	
Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 7		3	13.17	
Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 1		3	18.33	
Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 2		3	20.00	
Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 3		3	27.33	
Total		30		

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

Test Statistics(a,b)

	Jumlah liposom yang berdiameter kurang dari sama dengan 100	Jumlah liposom yang berdiameter lebih dari 100
Chi-Square	26.789	14.978
df	9	9
Asymp. Sig.	.002	.092

a Kruskal Wallis Test
b Grouping Variable: Perlakuan

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah liposom yang berdiameter kurang dari sama dengan 100 Bonferroni

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Liposom Kontrol Sonikasi Hari 0	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 7	191.00(*)	29.086	.000	80.35	301.65
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 1	238.00(*)	29.086	.000	127.35	348.65
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 2	304.67(*)	29.086	.000	194.01	415.32
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 3	358.33(*)	29.086	.000	247.68	468.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 0	105.67	29.086	.075	-4.99	216.32
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 7	179.33(*)	29.086	.000	68.68	289.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 1	242.00(*)	29.086	.000	131.35	352.65
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 2	294.67(*)	29.086	.000	184.01	405.32
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 3	304.67(*)	29.086	.000	194.01	415.32
	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 7	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 0	-191.00(*)	29.086	.000	-301.65
Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 1		47.00	29.086	1.000	-63.65	157.65
Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 2		113.67(*)	29.086	.039	3.01	224.32
Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 3		167.33(*)	29.086	.001	56.68	277.99
Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 0		-85.33	29.086	.369	-195.99	25.32
Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 7		-11.67	29.086	1.000	-122.32	98.99

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

		51.00	29.086	1.000	-59.65	161.65
	MgCl2 pH7 Bulan 2	103.67	29.086	.087	-6.99	214.32
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 3	113.67(*)	29.086	.039	3.01	224.32
Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 1	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 0	-238.00(*)	29.086	.000	-348.65	-127.35
	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 7	-47.00	29.086	1.000	-157.65	63.65
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 2	66.67	29.086	1.000	-43.99	177.32
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 3	120.33(*)	29.086	.023	9.68	230.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 0	-132.33(*)	29.086	.009	-242.99	-21.68
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 7	-58.67	29.086	1.000	-169.32	51.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 1	4.00	29.086	1.000	-106.65	114.65
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 2	56.67	29.086	1.000	-53.99	167.32
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 3	66.67	29.086	1.000	-43.99	177.32
Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 2	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 0	-304.67(*)	29.086	.000	-415.32	-194.01
	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 7	-113.67(*)	29.086	.039	-224.32	-3.01
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 1	-66.67	29.086	1.000	-177.32	43.99
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 3	53.67	29.086	1.000	-56.99	164.32
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 0	-199.00(*)	29.086	.000	-309.65	-88.35
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 7	-125.33(*)	29.086	.015	-235.99	-14.68
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 1	-62.67	29.086	1.000	-173.32	47.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 2	-10.00	29.086	1.000	-120.65	100.65
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 3	.00	29.086	1.000	-110.65	110.65
Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 3	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 0	-358.33(*)	29.086	.000	-468.99	-247.68
	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 7	-167.33(*)	29.086	.001	-277.99	-56.68
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 1	-120.33(*)	29.086	.023	-230.99	-9.68
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 2	-53.67	29.086	1.000	-164.32	56.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 0	-252.67(*)	29.086	.000	-363.32	-142.01
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 7	-179.00(*)	29.086	.000	-289.65	-68.35
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 1	-116.33(*)	29.086	.032	-226.99	-5.68

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

		-63.67	29.086	1.000	-174.32	46.99
		-53.67	29.086	1.000	-164.32	56.99
Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 0	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 0	-105.67	29.086	.075	-216.32	4.99
	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 7	85.33	29.086	.369	-25.32	195.99
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 1	132.33(*)	29.086	.009	21.68	242.99
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 2	199.00(*)	29.086	.000	88.35	309.65
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 3	252.67(*)	29.086	.000	142.01	363.32
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 7	73.67	29.086	.891	-36.99	184.32
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 1	136.33(*)	29.086	.006	25.68	246.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 2	189.00(*)	29.086	.000	78.35	299.65
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 3	199.00(*)	29.086	.000	88.35	309.65
Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 7	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 0	-179.33(*)	29.086	.000	-289.99	-68.68
	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 7	11.67	29.086	1.000	-98.99	122.32
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 1	58.67	29.086	1.000	-51.99	169.32
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 2	125.33(*)	29.086	.015	14.68	235.99
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 3	179.00(*)	29.086	.000	68.35	289.65
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 0	-73.67	29.086	.891	-184.32	36.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 1	62.67	29.086	1.000	-47.99	173.32
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 2	115.33(*)	29.086	.034	4.68	225.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 3	125.33(*)	29.086	.015	14.68	235.99
Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 1	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 0	-242.00(*)	29.086	.000	-352.65	-131.35
	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 7	-51.00	29.086	1.000	-161.65	59.65
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 1	-4.00	29.086	1.000	-114.65	106.65
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 2	62.67	29.086	1.000	-47.99	173.32
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 3	116.33(*)	29.086	.032	5.68	226.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 0	-136.33(*)	29.086	.006	-246.99	-25.68
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 7	-62.67	29.086	1.000	-173.32	47.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 2	52.67	29.086	1.000	-57.99	163.32

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

		62.67	29.086	1.000	-47.99	173.32
MgCl2 pH7 Bulan 2	Sonikasi Hari 0	-294.67(*)	29.086	.000	-405.32	-184.01
	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 7	-103.67	29.086	.087	-214.32	6.99
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 1	-56.67	29.086	1.000	-167.32	53.99
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 2	10.00	29.086	1.000	-100.65	120.65
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 3	63.67	29.086	1.000	-46.99	174.32
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 0	-189.00(*)	29.086	.000	-299.65	-78.35
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 7	-115.33(*)	29.086	.034	-225.99	-4.68
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 1	-52.67	29.086	1.000	-163.32	57.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 3	10.00	29.086	1.000	-100.65	120.65
Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 3	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 0	-304.67(*)	29.086	.000	-415.32	-194.01
	Liposom Kontrol Sonikasi Hari 7	-113.67(*)	29.086	.039	-224.32	-3.01
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 1	-66.67	29.086	1.000	-177.32	43.99
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 2	.00	29.086	1.000	-110.65	110.65
	Liposom Kontrol Sonikasi Bulan 3	53.67	29.086	1.000	-56.99	164.32
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 0	-199.00(*)	29.086	.000	-309.65	-88.35
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Hari 7	-125.33(*)	29.086	.015	-235.99	-14.68
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 1	-62.67	29.086	1.000	-173.32	47.99
	Liposom Sonikasi + MgCl2 pH7 Bulan 2	-10.00	29.086	1.000	-120.65	100.65

* The mean difference is significant at the .05 level.