



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI STABILITAS FISIK LIPOSOM TETRA ETER LIPID
(EPC-TEL 2,5) HASIL EKSTRUSI DAN SONIKASI SETELAH
PENYIMPANAN PADA SUHU KAMAR SELAMA TIGA
BULAN**

SKRIPSI

ADITYA TOGA SUMONDANG SARAGIH

NPM 0105007012

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN UMUM
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA
JUNI 2009**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI STABILITAS FISIK LIPOSOM TETRA ETER LIPID
(EPC-TEL 2,5) HASIL EKSTRUSI DAN SONIKASI SETELAH
PENYIMPANAN PADA SUHU KAMAR SELAMA TIGA
BULAN**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana
kedokteran**

ADITYA TOGA SUMONDANG SARAGIH

NPM 0105007012

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN UMUM
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA
JUNI 2009**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Aditya Toga Sumondang Saragih
NPM : 0105007012
Tanda Tangan :
Tanggal : 30 Juni 2009



LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Aditya Toga Sumondang Saragih
NPM : 0105007012
Program Studi : Kedokteran Umum Sarjana S1
Judul Skripsi :

Uji stabilitas fisik liposom tetra eter lipid (EPC-TEL 2,5) hasil ekstrusi dan sonikasi setelah penyimpanan pada suhu kamar selama tiga bulan

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. dr. Ernie H. Purwaningsih, MS ()

Penguji : Dr. dr. Saptawati Bardosono, MSc. ()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 28 Februari 2009

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa, hanya dengan kasih dan anugerahNya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini dengan baik.

Merupakan karunia yang besar bagi penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dengan judul perbandingan stabilitas fisik liposom tetra eter lipid (EPC-TEL 2,5) hasil ekstrusi dan sonikasi setelah penyimpanan pada suhu kamar selama tiga bulan, yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta.

Dengan segala kerendahan hati dan penuh rasa hormat, penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang setulus-tulusnya kepada Dr.dr.Ernie H. Purwaningsih, MS dari Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran FKUI dan Dr.dr. Saptawati Bardosono, MSc dari Departemen Gizi FKUI serta dr.Wawaimuli Arozal, MBIomed dari Departemen Farmakologi dan Teurapeutik FKUI yang telah membantu penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada teman-teman sejawat yang membantu penulis dalam memberikan referensi untuk tinjauan pustaka.

Penulis menyadari banyak sekali kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, baik dalam penyajian materi maupun dalam teknik penulisannya. Untuk itu kritik dan saran dari semua pihak dalam upaya penyempurnaan skripsi ini sangatlah penulis harapkan.

Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu kedokteran.

Jakarta, Februari 2009

Penulis

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

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

Nama : Aditya Toga Sumondang Saragih

NPM : 0105007012

Program Studi : Kedokteran Umum S1

Fakultas : Kedokteran Universitas Indonesia

Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Uji Stabilitas Fisik Liposom Tetra Eter Lipid (EPC-TEL 2,5) Hasil Ekstrusi dan Sonikasi setelah Penyimpanan pada Suhu kamar selama Tiga Bulan

beserta perangkat yang ada (bila diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (*database*), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di internet atau media lain untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/ pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta. Segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah ini menjadi tanggungjawab pribadi saya.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di Jakarta, Juni 2009

Yang menyatakan,

(Aditya Toga Sumondang Saragih)

NPM 0105007012

ABSTRAK

Nama : Aditya Toga Sumondang Saragih
Program Studi : Kedokteran Umum Sarjana S1
Judul : Uji stabilitas fisik liposom tetra eter lipid (EPC-TEL 2,5) hasil ekstrusi dan sonikasi setelah penyimpanan pada suhu kamar selama tiga bulan

Secara umum, obat yang digunakan pada pemberian sistemik dengan dosis tinggi untuk jangka panjang umumnya menyebabkan efek toksik. Salah satu upaya untuk menekan efek samping obat adalah dengan menginkorporasikan obat tersebut ke dalam pembawa obat (*drug carriers*) sehingga obat dapat langsung mencapai organ sasaran dengan dosis rendah. Salah satunya obat yang diteliti dan terbukti dapat menurunkan efek samping obat adalah liposom, yaitu liposom EPC-TEL2,5 yang belum teruji stabilitasnya secara fisik.

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan stabilitas liposom EPC-TEL2,5 dengan perlakuan ekstrusi dan sonikasi yang disimpan pada suhu kamar. Kestabilan liposom ditentukan dengan melihat perbandingan jumlah dan diameter liposom hari pertama sampai dengan akhir bulan ketiga. Dengan menggunakan uji nonparametrik Kruskal-Wallis didapatkan liposom yang berdiameter ≤ 100 nm dan > 100 nm masing-masing $p = 0,001$ dan $p = 0,031$ yaitu terdapat perbedaan bermakna jumlah liposom. Hasil dilanjutkan dengan analisis *post hoc* dengan Mann-Whitney didapatkan liposom ekstrusi diameter ≤ 100 nm tidak stabil pada hari ke-1 ($p = 0,016$) dan ekstrusi diameter > 100 nm sampai hari ke-7 ($p = 0,008$). Hasil sonikasi berdiameter ≤ 100 nm dan > 100 nm didapatkan $p = 0,917$ dan $p = 0,738$ menunjukkan stabil hingga hari ke-84.

Kata kunci :
EPC-TEL2,5, ekstrusi, sonikasi, stabilitas

ABSTRACT

Name : Aditya Toga Sumondang Saragih
Study Program : General medicine bachelor degree
Title : Physical stability of liposome tetra ether lipid (EPC TEL 2,5) by extrusion and sonication in room temperature after stored in three months

In general, drugs that are used systemically in high dose and for a long time are very toxic. Incorporating the drugs to drug carriers so that it can directly reach its target organ is an effort to prevent the drug's side effects. One of the drug carriers, which has been studied many times and proved to reduce drugs' side effects is liposome, especially EPC-TEL2,5 liposome.

The purpose of this study is to compare the stability of EPC-TEL2,5 liposome after being extruded, sonicated and stored in room temperature in three month. Liposome stability is determined by comparing liposome level and diameter since the first day until the end of third months. Using Kruskal-Wallis nonparametric test, we found that liposome ≤ 100 nm ($p = 0,001$) and liposome > 100 nm ($p = 0,031$). With post-hoc analysis Mann-Whitney, we found that liposome with extrusion ≤ 100 nm was stable until day-1. Liposome with extrusion > 100 nm was stable until day-7. Liposom with sonication ≤ 100 nm dan > 100 nm stable until day-84 ($p = 0,917$ and $p = 0,738$).

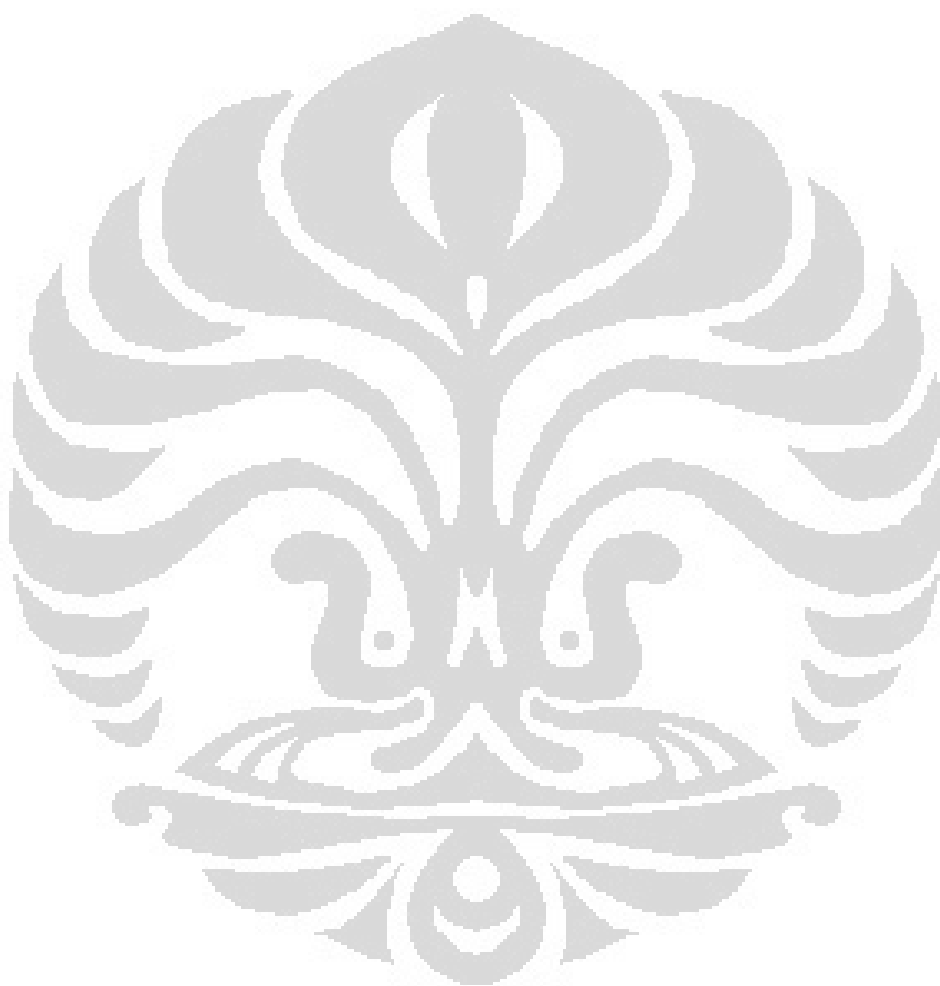
Key words :
EPC-TEL2,5, extrusion, sonication, stability

DAFTAR ISI

Halaman

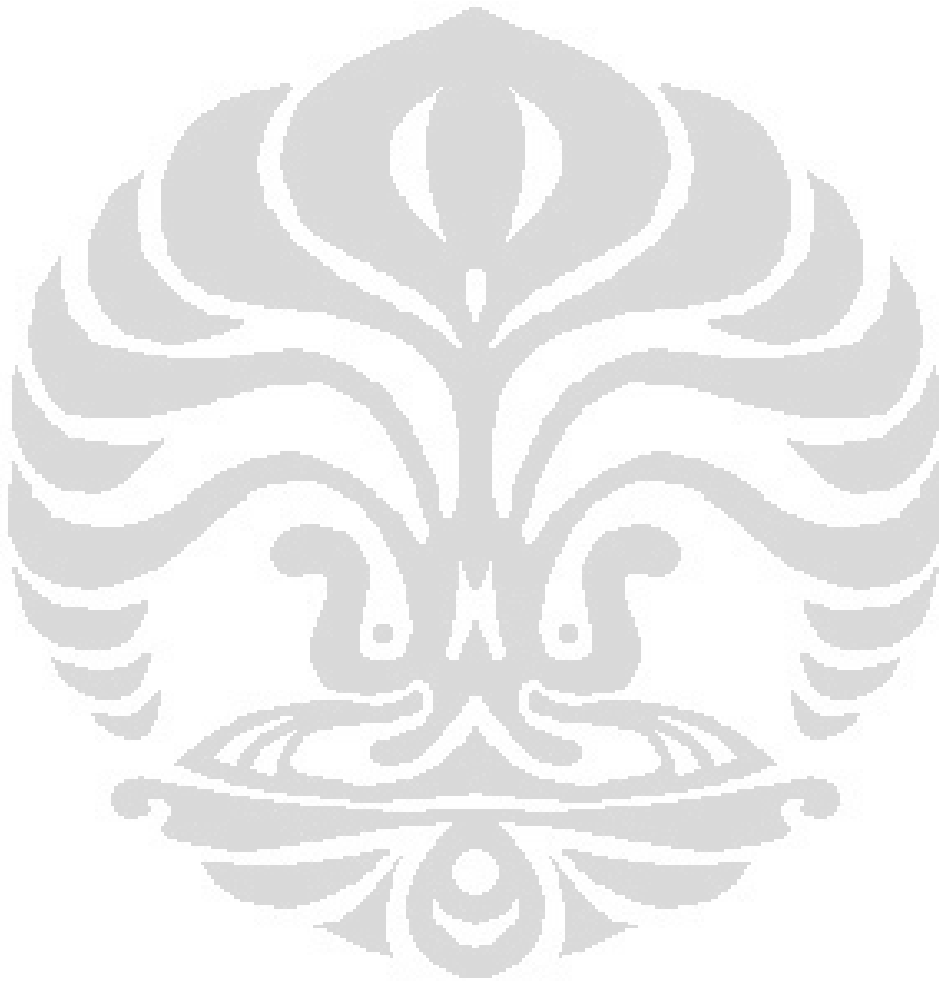
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
UCAPAN TERIMAKASIH.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	v
ABSTRAK.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTARTABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR SINGKATAN.....	xi
1. PENDAHULUAN.....	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.3.1 Tujuan Umum.....	2
1.3.2 Tujuan Khusus.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.5 Hipotesis.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	
2.1 Struktur Liposom.....	4
2.2 Farmakokinetik Liposom.....	5
2.3 Keuntungan Penggunaan Liposom.....	6
2.4 <i>Thermoplasma acidophilum</i> dan Tetraeter Lipid.....	8
2.4.1 <i>Thermoplasma acidophilum</i>	8
2.4.2 Tetraeter Lipid.....	8
2.5 Alat dan Metode untuk Mengubah Ukuran Liposom.....	10
2.5.1 Avestin Ekstruder.....	10
2.5.2 Sonikasi.....	12
2.6 Alat dan Metode untuk Menguji Kestabilan Liposom.....	12
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	
3.1 Desain Penelitian.....	14
3.2 Waktu dan Tempat.....	14
3.3 Besar Sampel.....	15
3.4 Kerangka Konsep.....	16
3.5 Bahan dan Alat.....	16
3.6 Cara Kerja.....	17
3.7 Rencana Manajemen dan Analisis Data.....	18
3.8 Definisi Operasional.....	18
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	19

5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	
5.1 Kesimpulan.....	26
5.2 Saran.....	26
DAFTAR PUSTAKA.....	27
LAMPIRAN.....	31
CURICULUM VITAE.....	35



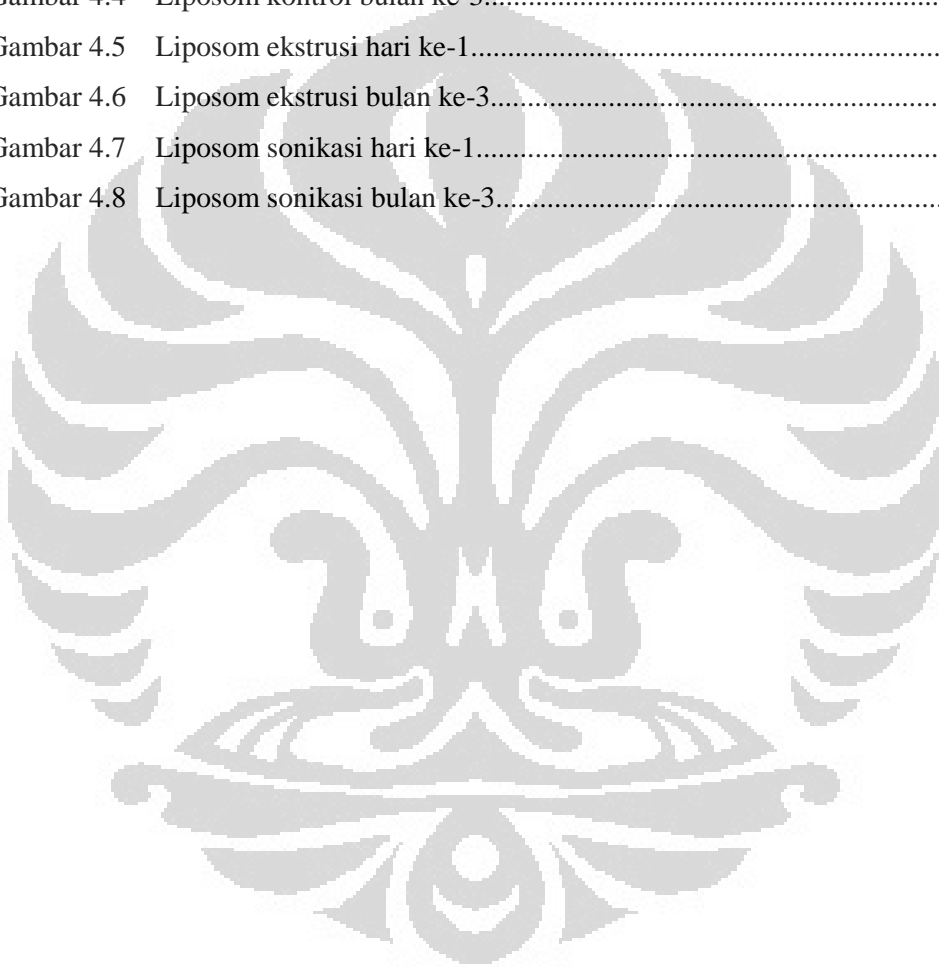
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil pengamatan liposom kontrol dan perlakuan.....	20
Tabel 4.2 Uji nonparametrik Kruskal Wallis (<i>software</i> SPSS 13).....	21
Tabel 4.3 Analisis <i>Post Hoc</i> liposom perlakuan ekstrusi (<i>software</i> SPSS 13)..	24
Tabel 4.4 Analisis <i>Post Hoc</i> liposom perlakuan ekstrusi (<i>software</i> SPSS 13)...	24



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Gambaran liposom (pembawa obat) yang berfusi dengan sel target..... 6
Gambar 2.2	Alat ekstruder liposom..... 11
Gambar 4.1	Pengukuran diameter liposom skala Olympus perbesaran 400 kali..... 19
Gambar 4.2	Mikroskopik liposom pada hari ke-7, perbesaran 400 x..... 21
Gambar 4.3	Liposom kontrol hari ke-1..... 22
Gambar 4.4	Liposom kontrol bulan ke-3..... 22
Gambar 4.5	Liposom ekstrusi hari ke-1..... 22
Gambar 4.6	Liposom ekstrusi bulan ke-3..... 22
Gambar 4.7	Liposom sonikasi hari ke-1..... 23
Gambar 4.8	Liposom sonikasi bulan ke-3..... 23



DAFTAR SINGKATAN

EPC	<i>Egg-yolk PhosphatidylCholine</i>
TEL	<i>Tetra Eter Lipid</i>
SPC	<i>Soy- bean PhosphatidylCholine</i>
ULV	<i>Unilamellar Vesicle</i>
MLV	<i>Multilamellar Vesicle</i>
SUV	<i>Single Unilamellar Vesicle</i>



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Perkembangan teknologi farmasi yang maju pesat saat ini telah sampai pada upaya untuk menurunkan efek samping obat seminimal mungkin. Salah satunya dengan menginkorporasikan obat tersebut ke dalam pembawa obat (*drug carrier*) sehingga obat dapat langsung mencapai organ sasaran. Pembawa obat haruslah mempunyai ciri-ciri tidak toksik, tidak mutagenik, maupun tidak imunogenik. Salah satu contoh pembawa obat adalah liposom.

Liposom merupakan salah satu produk teknologi nano (*nanotechnology*) dengan ukuran antara 20 nm hingga 100 μ m dengan ketebalan dwilapis lipid sebesar 4 nm. Untuk aplikasi di bidang kedokteran, digunakan liposom berukuran 80-200 nm. Liposom yang berukuran 50-200 nm dapat dibuat dari berbagai komponen lipid misalnya lesitin dari kuning telur atau kedelai atau dengan tetra eter lipid (TEL). Tetra eter lipid yang digunakan merupakan hasil ekstraksi membran Archaea, antara lain dari *Sulfolobus acidocaldarius* atau *Thermoplasma acidophilum*. Freisleben, dkk.⁴⁻⁵ membuktikan bahwa TEL dari *Thermoplasma acidophilum* terbukti tidak toksik, tidak mutagenik atau antimutagenik pada uji toksisitas akut.⁶

Purwaningsih, dkk mengembangkan komposisi terbaru liposom, yaitu liposom EPC-TEL2,5. Liposom ini mengandung lesitin/fosfatidilkolin kuning telur (*egg yolk phosphatidyl choline*) dan TEL (tetra eter lipid) 2,5 mol % dari *Thermoplasma acidophilum*. Liposom ini dapat mengikat obat metilprednisolon palmitat lebih baik dan terbukti menunjukkan efek terapi, efek imunologik, serta terdistribusi dengan baik dalam organ yang berbeda bermakna dibandingkan kontrol yaitu metilprednisolon tanpa liposom.⁶⁻⁹ Akan tetapi, keberhasilan tersebut belum didukung oleh data kestabilan fisik liposom EPC-TEL2,5 secara *in vitro*.

Untuk membuktikan bahwa liposom EPC-TEL2,5 sebagai pembawa obat secara fisika perlu dilakukan penelitian tentang uji stabilitasnya.

Apabila kestabilan liposom EPC-TEL2,5 telah diketahui, diharapkan dapat dimanfaatkan lebih luas sebagai pembawa obat-obat golongan lain untuk meningkatkan efektivitas obat dan menurunkan efek sampingnya serta aman digunakan dalam jangka panjang.

Keberhasilan liposom EPC-TEL2,5 sebagai pembawa obat dapat memicu industri farmasi memanfaatkannya sebagai pembawa obat terhadap obat unggulannya yang selama ini dinilai cukup efektif, namun menunjukkan efek samping yang tinggi.

1.2. Rumusan Masalah

Liposom sebagai pembawa (*drug carrier*) secara umum telah terbukti meningkatkan efektivitas dan menurunkan efek samping obat, namun TEL dari liposom EPC-TEL2,5 yang mengandung TEL dari *Thermoplasma acidocaldarium* sebesar 2,5 mol% sebagai formulasi liposom baru, belum pernah diuji tentang kestabilan fisika secara *in vitro*.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian dilakukan untuk menguji stabilitas liposom EPC-TEL2,5 secara fisik.

1.3.2. Tujuan Khusus

- 1) Menguji stabilitas fisik liposom EPC-TEL2,5 dengan cara menghitung jumlah dan diameter partikel liposom setelah diekstrusi 200 nm dan diamati pada hari ke-0, hari ke-7, hari ke-28, hari ke-56, dan hari ke-84, yang disimpan suhu kamar.
- 2) Menguji stabilitas fisik liposom EPC-TEL2,5 dengan cara menghitung jumlah dan diameter partikel liposom setelah disonikasi dan diamati pada

hari ke-0, hari ke-7, hari ke-28, hari ke-56, dan hari ke-84, yang disimpan pada suhu kamar.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan bahwa liposom EPC-TEL2,5 yang stabil secara fisik akan bermanfaat dalam pengembangan bidang *nanotechnology* untuk terapi jangka panjang terutama bagi industri. Bagi peneliti lain sebagai acuan untuk melakukan penelitian pada masa yang akan datang

1.5. Hipotesis

- 1) Liposom EPC-TEL2,5 dengan ekstrusi 200 nm berdiameter ≤ 100 nm dan > 100 nm stabil secara fisik pada suhu kamar dalam waktu penyimpanan selama 84 hari.
- 2) Liposom EPC-TEL2,5 dengan sonikasi berdiameter ≤ 100 nm dan > 100 nm stabil stabil secara fisik pada suhu kamar dalam waktu penyimpanan selama 84 hari.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Struktur Liposom

Liposom merupakan suatu membran vesikel yang dibentuk dengan cara mendispersikan suatu lipid, terutama fosfolipid, ke dalam media cair dan memiliki sifat-sifat yang memenuhi persyaratan sebagai pembawa obat atau vehikulum atau *drug-carrier*.¹⁻²

Struktur liposom pertama kali ditemukan oleh Alec B dari Cambridge pada awal tahun 1960, namun liposom sebagai pembawa obat telah dipatenkan pada tahun 1943 berupa campuran air antara lesitin dan kolesterol. 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.¹

Fosfolipid merupakan komponen struktural membran biologik yang terutama terdiri atas fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin dan fosfatidilinositol.³⁻⁶ Fosfolipid yang lazim digunakan pada pembuatan liposom konvensional adalah lesitin (fosfatidilkolin) dari kuning telur (*Egg-yolk phosphatidylcholine* = EPC), jaringan otak, kedelai (*soy-bean phosphatidylcholine* = SPC) atau yang dibuat secara sintetik. Lipid bermuatan seperti fosfatidilserin atau fosfatidilgliserol seringkali di tambahkan sebagai stabilisator.⁷ Lipid yang dapat digunakan sebagai stabilisator membran liposom, yang saat ini masih belum banyak digunakan adalah tetra eter lipid (TEL) dari membran sel Archea, yaitu antara lain *Thermoplasma acidophilum*⁸⁻⁹ dan *Sulfolobus acidocaldarius*.¹⁰

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

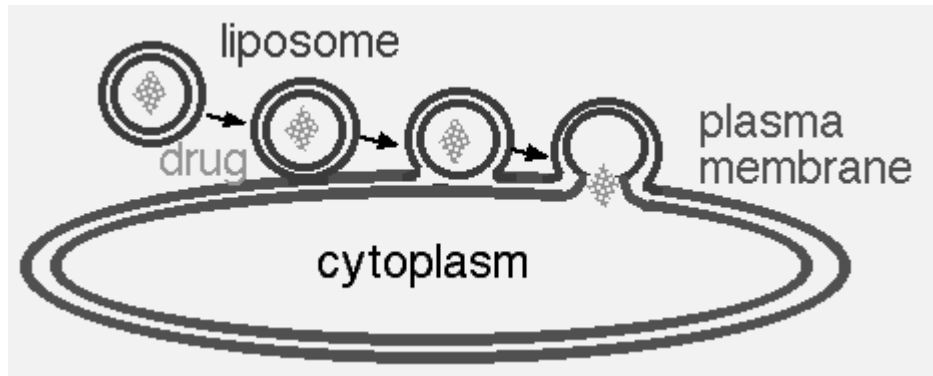
Persyaratan lain untuk penggunaan liposom sebagai pembawa obat adalah stabilitas baik fisik, kimia maupun biologi dan jumlah lapisan membran lipid per liposom. Jumlah lapisan membran dan besar ukuran liposom ditentukan oleh cara pembuatannya.¹⁰⁻¹¹

Kelarutan obat dalam air atau dalam lipid berpengaruh pada inkorporasi serta derajat retensi obat di dalam liposom. Obat yang bersifat hidrofil dengan koefisien partisi oktanol terhadap air ($\log P_{oct}$) < 1,7 akan tertahan di dalam fasa air bagian dalam (*aqueous interior*) atau di dalam vesikel dan akan dilepaskan secara lambat dalam beberapa jam atau hari. Obat dengan $\log P_{oct}$ > 5 atau bersifat hidrofob, akan tertanam di antara fasa hidrofob interior dari lapisan dwilapis lipid (*lipid bilayer*) yang diretensi dengan sempurna dalam liposom.¹²

2.2 Farmakokinetik Liposom

Sebagaimana lipid atau lemak lainnya pemberian liposom peroral akan dipecah secara enzimatik sebelum masuk ke dalam sirkulasi darah. Oleh karena itu, masih sedikit hasil penelitian yang menggunakan liposom untuk pemberian peroral. Keberhasilan liposom sebagai pembawa obat ditentukan oleh berbagai faktor, antara lain faktor yang berpengaruh terhadap bersihan darah. Liposom konvensional dipengaruhi oleh ukuran liposom, muatan, fase transisi dan ada atau tidaknya kolesterol pada membran serta dosis lipid¹²⁻¹³. Liposom yang dibuat secara konvensional atau dikenal juga sebagai liposom klasik, mempunyai waktu utuh vesikel yang pendek dan tidak stabil dalam lingkungan biologik seperti serum.

Penggunaan liposom sebagai pembawa obat telah banyak dimanfaatkan, baik yang masih bersifat eksperimental maupun yang telah dipasarkan sebagai produk parenteral atau topikal untuk penderita. Berbagai sediaan liposom yang telah diuji efeknya pada manusia dapat mengandung antibiotika, fungisid, vaksin atau obat anti inflamasi.¹⁴⁻¹⁶



Gambar 2.1 Gambaran liposom (pembawa obat) yang berfusi dengan sel target¹

Dalam banyak penelitian telah digunakan liposom sebagai pembawa obat dengan alasan bahwa liposom terbukti dapat memperpanjang waktu paruh obat serta dapat memperbesar distribusi obat ke organ sasaran secara selektif, sehingga dosis obat dapat diperkecil. Dengan demikian, efek samping obat dapat ditekan serendah mungkin.

2.3. Keuntungan Penggunaan Liposom

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

- 1). Penyuntikan liposom-metilprednisolon (L-MPL) 2mg/kgBB, IV pada tikus jantan dewasa galur *Sprague-Dawley* dibandingkan dengan metilprednisolon (MPL) berbentuk larutan pada dosis yang sama menunjukkan, bahwa distribusi obat di berbagai organ, 1 jam setelah penyuntikan, kadar L-MPL jauh lebih tinggi di limpa, timus, ginjal dan terutama di hepar, dibandingkan dengan MPL. Hal ini disebabkan karena kemampuan penetrasi L-MPL ke jaringan lebih lambat akibat besarnya ukura 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. Kadar L-MPL tidak terdeteksi lagi di paru-paru, jantung, otot dan ginjal setelah 4 jam penyuntikan. Kedua bentuk sediaan tersebut tidak terdeteksi kadarnya di dalam sumsum tulang dan otak.¹⁷

- 2). Pemberian L-MPL dengan dosis tersebut terbukti memperpanjang waktu paruh dari 0,48 jam untuk MPL menjadi 30,13 jam untuk LMPL, meningkatkan volume distribusi dari 2,1 menjadi 21,87 L/kgg. Kadar obat dalam volume distribusi meningkat dari 339 menjadi 1093 ng/jam/mL. 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 4mg/kgBB/hari, setiap hari dengan risiko, bahwa timbulnya efek samping juga meningkat.¹⁸⁻²⁰
- 3). Pemberian liposom-siklosporin (L-CsA) sebesar 1,755 mg/kg/hari selama seminggu pada tikus jantan dewasa galur Lewis pasca transplantasi hati, ketahanan hidup diperpanjang hingga 92,6 hari. Delapan puluh % di antaranya tetap bertahan hingga 100 hari, dibandingkan dengan kontrol yang hanya mendapat siklosporin dengan dosis yang sama. Ketahanan hidup dari 50% tikus dalam kelompok kontrol, hanya selama 51,33 hari. Ambilan obat L-CsA oleh hati pada 2 jam setelah penyuntikan, lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kontrol. Toksisitas siklosporin pada ginjal yang diuji berdasarkan kadar kreatinin serum secara serial menurun bermakna pada L-CsA dibandingkan dengan kontrol.²¹
- 4). Saat ini liposom juga dimanfaatkan sebagai bahan pembawa untuk terapi gen berbagai komposisi liposom dan modifikasinya telah diujikan agar gen yang dimaksud langsung mencapai sel sasaran.²⁵⁻²⁶

Namun demikian, liposom sendiri dapat atau dimungkinkan menjadi antigen yang akan dirusak oleh sistem imun apabila di dalam komposisinya, terdapat sfingolipid, kardiopilin, kolestrol dalam jumlah tinggi, lebih dari 71 mol % atau lipid A (endoksiosin dari suatu bakteri Gram negatif).²²

2.4. *Thermoplasma acidophilum* dan Tetraeter Lipid

2.4.1. *Thermoplasma acidophilum*

Thermoplasma acidophilum (*Th.acidophilum*) merupakan *archaebacterium* asidofilik dengan pertumbuhan optimum pada suhu 59⁰C dan pada 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 bipolar ini membentuk liposom yang stabil hingga diameter minimum (150 nm).

Liposom dengan fosfolipid utama dari *Thermoplasma acidophilum* (*Th.acidophilum*) ini tidak dihancurkan oleh agen oksidasi dan hidrolisis seperti asam. 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 jalur gastrointestinal.

2.4.2. Tetraeter Lipid

TEL adalah salah satu produk hasil ekstraksi dari Archaea terutama yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum*, telah teruji tidak toksik dan tidak bersifat mutagenik atau antimutagenik, baik *in vitro* maupun *in vivo*^{27,29}. TEL yang berasal dari *Sulfolobus acidocaldarius*, walaupun sudah digunakan dalam penelitian, namun belum teruji toksisitas seperti pada *Thermoplasma acidophilum*. Lipid hasil ekstraksi membran dari Archaea tersebut berbeda secara nyata bila dibandingkan dengan fosfolipid pada membran sel lain yang membentuk dwilapis lipid (*lipid bilayer*).

Struktur membran tanpa ikatan rangkap ini mempunyai gugus metil samping yang sebagian membentuk pentasiklik, tanpa atau dengan residu fosfat yang terikat melalui ikatan ester. Ikatan eter-gliserol sangat resisten terhadap hidrolisis pada pH rendah sehingga memberi keuntungan lain dibandingkan dengan ikatan ester. Ketiadaan ikatan rangkap dalam struktur TEL akan meningkatkan resistensi terhadap oksidasi, sedangkan adanya gugus metil

samping akan menambah efek fluiditas. Karena itu, liposom satu lapisan lipid (monolayer) yang dibentuk dari tetraeter lipid (TEL) dari Archaea tersebut, bersifat stabil dengan ikatan yang cukup erat.^{7-9, 28}

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.²⁸

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.²⁸⁻²⁹

Uji toksisitas TEL *Thermoplasma acidophilum* pada sel dengan menggunakan sel limfoma mencit L5178Y (EMAT cells) ataupun uji mutagenitas atau antimutagenitas pada *Salmonella typhimurium* TA100 membuktikan, bahwa TEL tidak toksik dan tidak mempunyai sifat mutagenik.²⁷ Uji toksisitas terhadap saraf pusat pada mencit NMRI dan uji ketahanan hidup dengan supresi imun juga membuktikan bahwa TEL tidak toksik dan dapat memperpanjang daya tahan hidup sedikit lebih lama dibandingkan kontrol.²⁷⁻²⁸ Dosis letal 50 (LD50) TEL pada uji tersebut adalah lebih dari 324 mg/kgBB.³⁰

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.³⁰

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

Hasil penelitian terbaru dari Patel dkk.³¹ 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 tersebut. Uji stabilitas yang dilakukan adalah untuk membuktikan bahwa 1) daya untuk menahan pelepasan ¹⁴C-glukosa dari dalam vesikel, berurutan, sebesar 20%,80%,90%,95% pada pH 1,5; 2,0; 2,5; dan 6,2 dalam waktu 90 menit, pada suhu 37°C. 2) ketahanan vesikel terhadap paparan lipase pankreas dan zat yang mirip empedu manusia masih berkisar 13% setelah 90 menit pada pH 6,2. Penelitian ini juga membuktikan bahwa MLV dari ketiga jenis membran Archaea lebih stabil daripada bentuk ULV (*unilamellar vesicle*). Hasil tersebut nantinya akan dikembangkan untuk pembentukan sediaan oral dengan archaeosome sebagai zat pembawa obat.³¹

2.5. Alat dan Metode untuk Mengubah Ukuran Liposom

Ukuran liposom dapat diubah dengan menggunakan beberapa cara, diantaranya adalah dengan menggunakan alat Avestin *extruder* dan metode sonikasi.

2.5.1. Avestin Extruder

Avestin *Extruder* merupakan alat penyaring yang dapat membuat vesikel unilamellar yang berukuran sampai 1 mililiter dari vesikel multilamellar.² Alat

penyaring ini terdiri dari dua *syringe* yang dapat didorong ke depan dan ke belakang, sehingga meminimalisir ukuran molekul, mengurangi penggantian filter selama berlangsungnya proses pembuatan unilamellar dan mempersingkat waktu. Diameter rata-rata vesikel unilamellar mendekati ukuran pori-pori filter yang mengekstrusi. Ekstrusi *per se* dapat mempertahankan kestabilan vesikel, yang terperangkap dalam *fluorescent dye* ketika mereka dihancurkan pada *freezing-thawing* dan selama ekstrusi pertama yaitu saat hampir semua vesikel multilamellar diubah menjadi vesikel unilamellar.

Vesikel unilamellar yang besar dihasilkan oleh teknik ekstrusi memiliki beberapa keuntungan: bebas dari pelarut organik dan deterjen, pengaturan konstituen lipid dalam keadaan seimbang dan mempertahankan kestabilan vesikel, ukuran dan strukturnya relatif homogen, membran sel menjadi unilamellar dan dapat diisi dengan volume yang cukup besar, dapat disiapkan dengan cepat dan mudah dari lipid kering dalam waktu kurang dari 1 jam.



Gambar 2.2 Alat ekstruder liposom²

Alat penyaring ini dirancang untuk dapat digunakan secara manual, tidak di bawah pengaruh tekanan gas. Alat ini dapat mempertahankan kebersihannya karena sampel yang digunakan dapat didorong ke depan dan ke belakang melalui filter.

Fitur yang esensial dari *mini-extruder* ini adalah:

- Volum sampel untuk ekstrusi memungkinkan 0,25 ml untuk melewati filter.

- Kemampuan untuk mempertahankan tekanan sehingga membran filter tidak bocor atau ruptur.

2.5.2 Sonikasi

Penghancuran suspensi vesikel multilamellar yang besar (LMV) dengan menggunakan energi suara (sonikasi) biasanya menghasilkan vesikel unilamellar yang kecil (SUV) dengan diameter berkisar antara 15-50 nm. Peralatan yang paling umum untuk persiapan partikel yang akan disonikasi adalah kontainer yang berisi air dan *probe tip sonicators*. Sonikator tipe *cup-horn* walaupun jarang digunakan secara luas, berhasil memproduksi SUV. *Probe tip sonicators* menghantarkan input energi yang tinggi kepada suspensi lemak tetapi panas yang berlebihan membuat suspensi mengalami degradasi. *Sonication tips* juga cenderung melepaskan partikel-partikel titanium ke dalam suspensi lipid yang harus disingkirkan dengan menggunakan sentrifugasi. Dengan alasan-alasan ini, *bath sonicators* merupakan peralatan yang paling sering digunakan dalam preparasi SUV.³³

Sonikasi partikel LMV dilakukan dengan menempatkan tabung sampel yang mengandung partikel suspensi ke dalam *bath sonicators* (atau menempatkan *tip sonicator* dalam tabung sampel) dan disonikasi selama 5-10 menit di atas temperatur transisi dari gel ke cairan. Suspensi lipid harus segera diklarifikasi untuk menghasilkan larutan yang sedikit berkabut. Kabut ini diakibatkan karena penyebaran cahaya yang diinduksi oleh partikel-partikel residu yang besar dalam larutan suspensi. Partikel-partikel ini dapat disingkirkan dengan sentrifugasi untuk menghasilkan suspensi SUV yang jernih. Ukuran rata-rata dan distribusi dipengaruhi oleh komposisi dan konsentrasi, suhu, waktu, dan kekuatan sonikasi, dan volume. Karena sangat tidak mungkin untuk menghasilkan kondisi sonikasi, variasi ukuran yang dihasilkan dalam setiap kali melakukan sonikasi pada waktu yang berbeda sangatlah umum. Partikel-partikel SUV sangat tidak stabil dan akan berubah secara spontan membentuk vesikel yang lebih besar ketika disimpan di bawah temperatur fase transisi.³³

D. Alat dan Metode untuk Menguji Kestabilan Liposom

Untuk menguji kestabilan liposom, dapat dipakai metode kromatografi atau menggunakan mikroskop. Dalam penelitian ini digunakan mikroskop dengan kamera CCD (kamera terhubung komputer untuk melihat preparat liposom secara langsung dari monitor).

Mikroskop merupakan alat bantu mengamati obyek yang berukuran sangat kecil. Ada dua jenis mikroskop berdasarkan pada kenampakan obyek yang diamati, yaitu mikroskop dua dimensi (mikroskop cahaya) dan mikroskop tiga dimensi (mikroskop stereo). Sedangkan berdasarkan sumber cahayanya, mikroskop dibedakan menjadi mikroskop cahaya dan mikroskop elektron. Yang akan dibahas di sini adalah mikroskop cahaya.

Mikroskop cahaya mempunyai perbesaran maksimum 1000 kali dengan dudukan yang kuat, sehingga dapat berdiri dengan stabil. Mikroskop cahaya mempunyai tiga jenis lensa, yaitu lensa obyektif, lensa okuler, dan kondensor. Lensa obyektif dan lensa okuler terletak pada kedua ujung tabung mikroskop. Lensa okuler pada mikroskop bisa berbentuk lensa tunggal (*monokuler*) atau ganda (*binokuler*). Pada ujung bawah mikroskop terdapat tempat dudukan lensa obyektif yang dapat dipasangi tiga lensa atau lebih. Di bawah tabung mikroskop terdapat meja mikroskop yang merupakan tempat preparat. Sistem lensa yang ketiga adalah kondensor. Kondensor berperan untuk menerangi obyek dan lensa-lensa mikroskop yang lain.

Pada mikroskop konvensional, sumber cahaya masih berasal dari sinar matahari yang dipantulkan dengan suatu cermin datar ataupun cekung yang terdapat dibawah kondensor. Cermin ini akan mengarahkan cahaya dari luar kedalam kondensor. Pada mikroskop modern sudah dilengkapi lampu sebagai pengganti sumber cahaya matahari.

Kamera CCD dihubungkan ke lensa objektif mikroskop sehingga didapatkan gambaran liposom melalui preparat berupa jumlah dan diameter yang langsung ditampilkan ke layar komputer secara langsung.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan desain eksperimental untuk menguji stabilitas fisik formulasi terbaru liposom Tetra Eter Lipid (EPC-TEL 2,5) hasil sonikasi dan ekstrusi 200 nm pada suhu kamar selama tiga bulan.

3.2. Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan Departemen Farmasi Kedokteran, Farmakologi dan Fisika FKUI selama 1 tahun.

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

Penelitian ini akan dilaksanakan di tiga tempat:

1. Departemen Farmasi Kedokteran FKUI
Jl. Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat 10430
2. Departemen Farmakologi FKUI
Jl. Salemba Raya No.6 Jakarta Pusat 10430
3. Departemen Fisika Kedokteran FKUI
Jl. Salemba Raya No.6 Jakarta Pusat 10430

3.3. Besar Sampel

Besar sampel penelitian ini dihitung dengan rumus Federer:

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

Keterangan:

n = jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t = jumlah kelompok perlakuan

Nilai t adalah 15 berdasarkan perlakuan kelompok kontrol, ekstrusi dan sonikasi pada suhu kamar di hari ke-0, hari ke-7, hari ke-28, hari ke-56 dan hari ke-84.

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

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

$$14n - 14 \geq 15$$

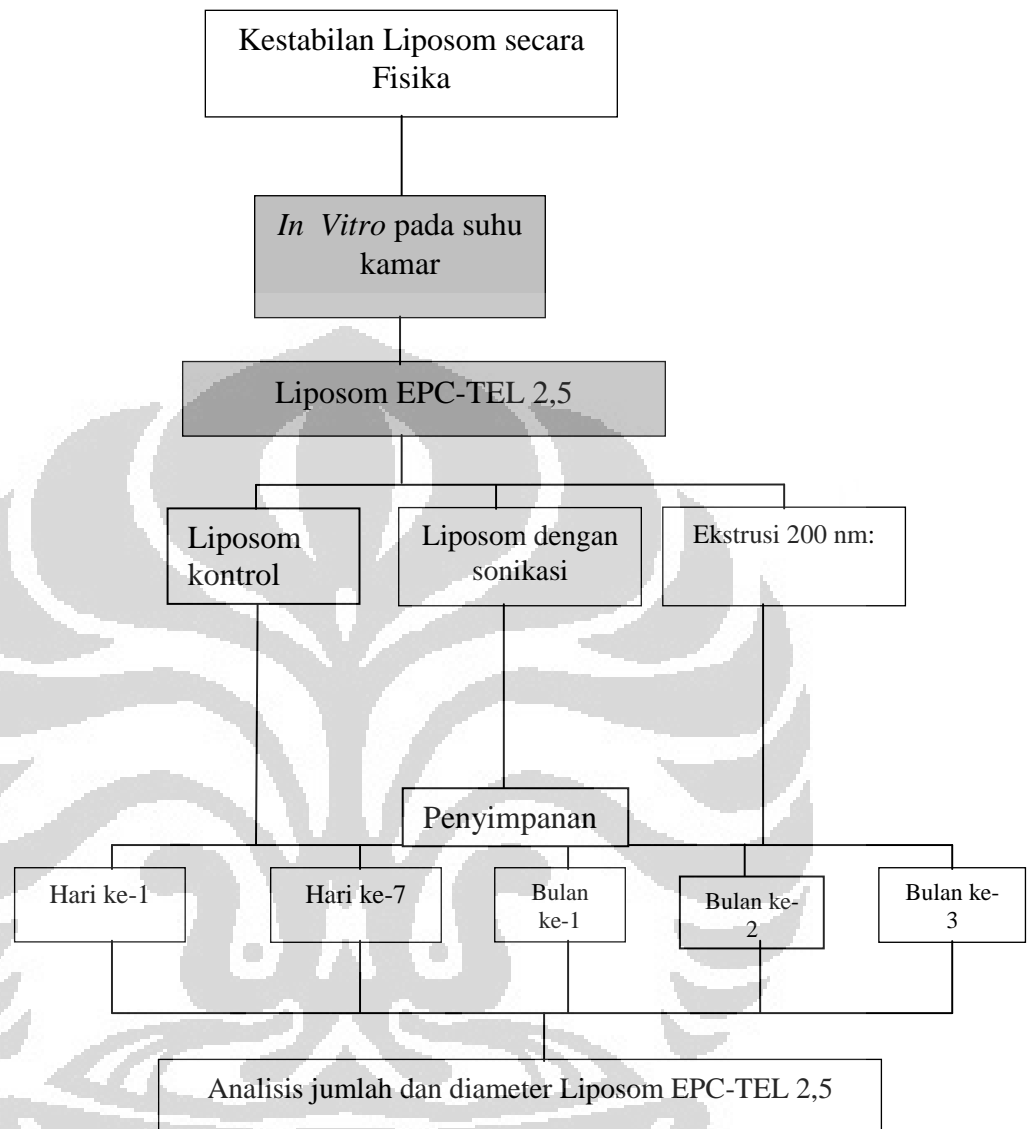
$$14n \geq 15 + 14$$

$$14n \geq 29$$

$$n \geq 2,071$$

Berarti, besar sampel tiap kelompok yang dibutuhkan untuk peneliti adalah lebih atau sama dengan 2.

3.4. Kerangka Konsep



3.5 Bahan dan Alat

1. Bahan dan reagen habis pakai : fosfatidilkolin dari kuning telur (EPC) Lipoid[®] dan tetra eter lipid (TEL) dari *Thermoplasma acidophilum* yang diperoleh dari IFB-Jerman, kloroform, etanol 98 %, aquabidestilasi, dan *quinacrine* 0,005 % sebagai pewarna liposom.
2. Alat-alat: *rotavapor-vacum pump waterbath Büchi*, sentrifus, gelas objek berskala Olympus, ekstruder, *filter* 200 nm, timbangan analitik, mikroskop yang disambungkan ke kamera Sony CCD-IRIS *color video camera*.

3.6 Cara Kerja

1. Pembuatan Liposom

Semua alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dengan etanol 70 %, kemudian dengan akuabides dan dicuci lagi dengan etanol. EPC dan TEL ditimbang sesuai dengan perhitungan yang terdapat pada lampiran dan dimasukkan ke dalam labu waterbath Büchi. Dalam tabung yang lain dibuat campuran 20 ml etanol 98 % dan 20 ml kloroform. Sebanyak 1 ml campuran tersebut diambil untuk melarutkan EPC dan TEL, kemudian sisanya dituangkan ke dalam labu atau *round bottom glass*. Labu dipasang pada tempatnya, *waterbath* Büchi diisi dengan air sampai seperempat bagian labu terendam dan dipanaskan dengan suhu 40°C. Tombol pemutar, mesin vakum, dinyalakan dan tekanannya diatur sehingga turun perlahan mencapai 200 milibar. Bila larutan di dalam labu sudah mengalami evaporasi dan terbentuk lapisan putih, tekanan diturunkan perlahan hingga mencapai tekanan di bawah 50 milibar. Proses pemutaran dihentikan apabila aroma campuran kloroform dan etanol dari labu tidak tercium lagi. *Round bottom glass* yang berisi liposom yang berbentuk lapisan putih tipis kemudian disimpan di lemari es sementara menunggu hari dilakukannya pengamatan pertama. Pada pengamatan hari pertama, lapisan putih liposom kemudian dilarutkan dengan akuabides sebanyak 50 ml. Selanjutnya larutan *quinacrine* 0,005 % ditambahkan ke dalam larutan liposom.

Liposom EPC-TEL 2,5 yang sudah ditambah dengan larutan *quinacrine* kemudian diekstrusi dengan ekstruder 200 nm dan disonikasi yang selanjutnya disimpan pada suhu kamar. Lama penyimpanan dalam penelitian ini ditetapkan selama tiga bulan (kurang lebih 84 hari), jangka waktu yang dirasa cukup efektif untuk penyimpanan sediaan liposom.

2. Perlakuan Terhadap Liposom (pada hari ke-1 dan seterusnya)

Liposom ditetaskan sebanyak 25 mikroliter pada kaca objek berskala, kemudian ditutup dengan kaca penutup dan diamati dengan *image processing unit* yang terdiri dari mikroskop, *CCD camera* dan komputer dengan pembesaran 10x40 kali. Dalam pengamatan diambil gambar sebanyak sepuluh lapang pandang tiap kelompok perlakuan dan satu buah video berdurasi 15 detik. Liposom

Universitas Indonesia

dibedakan dari partikel *quinacrine* berdasarkan karakteristik partikel liposom memiliki halo dan gerak Brown. Kemudian, jumlah dan diameter liposom dihitung persepuluh lapang pandang. Diameter liposom diukur berdasarkan skala pada kaca objek Olympus.

3.7 Rencana Manajemen dan Analisis Data

Kestabilan liposom ditentukan dengan membandingkan jumlah dan diameter liposom dengan variabel diameter ≤ 100 nm dan diameter > 100 nm pada hari pertama, hari ke-7, hari ke-28 (bulan ke-1), hari ke-56 (bulan ke-2), dan hari ke-84 (bulan ke-3). Perbedaan jumlah yang signifikan dan bermakna menunjukkan liposom tidak stabil.

Gambar liposom yang telah diperoleh dengan kamera dan mikroskop dihitung dan dijumlahkan persepuluh lapang pandang tiap perlakuan. Perhitungan tersebut dilakukan sebanyak lima kali sesuai dengan hasil yang diperoleh dari perhitungan dengan rumus Federer.

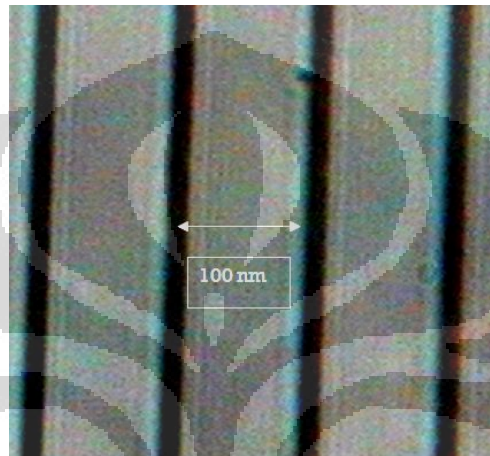
Data yang telah diperoleh dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis menggunakan program komputer SPSS 13.¹⁴

3.8 Definisi Operasional

1. Tetra eter lipid (TEL) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan TEL yang diekstraksi dari bakteri *Thermoplasma acidophilum*.
2. EPC-TEL 2,5 adalah suatu liposom yang merupakan kombinasi *egg yolk phosphatidilcholine* dengan TEL yang konsentrasinya 2,5 mol % dari konsentrasi EPC.
3. Uji stabilitas fisik yang dimaksud dalam proposal ini adalah mengukur jumlah dan ukuran partikel liposom (*in vitro*) persatuan waktu.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penghitungan liposom pada penelitian ini dibagi menjadi dua kategori, yaitu liposom dengan ukuran diameter ≤ 100 nm dan > 100 nm. Diameter liposom diukur berdasarkan skala Olympus (perbesaran 400 kali).



Gambar 4.1 Pengukuran diameter liposom dengan skala Olympus perbesaran 400 kali. Jarak antara kedua garis 100 nm

Pengamatan jumlah dan diameter liposom dilakukan sebanyak lima kali yaitu selama tiga bulan mulai dari hari-0, hari ke-7, hari ke-28, hari ke-56 dan hari ke-84. Pengamatan dilakukan oleh lima peneliti dengan bantuan alat mikroskop cahaya dengan kamera CCD-IRIS dan komputer.

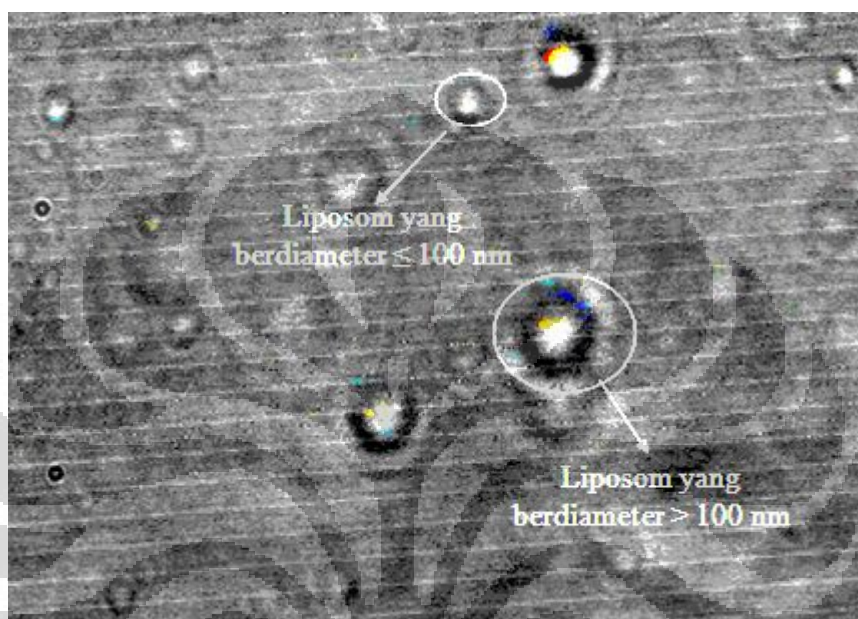
Pada penelitian terhadap kelompok control dan kelompok perlakuan pada suhu kamar yang dilakukan dengan pengamatan pada lima peneliti dalam kurun waktu tiga bulan didapatkan hasil seperti yang digambarkan dalam tabel 1.

Tabel 4.1 Hasil pengamatan liposom kontrol dan perlakuan

Waktu pengamatan		Kelompok kontrol		Kelompok perlakuan suhu kamar			
				Sonikasi		Ekstrusi	
		≤ 100 nm	> 100 nm	≤ 100 nm	> 100 nm	≤ 100 nm	> 100 nm
Hari ke-0	Data I	197	5	159	1	84	5
	Data II	110	45	106	36	70	6
	Data III	145	0	114	0	41	23
	Data IV	382	0	282	0	124	18
	Data V	195	1	147	1	68	6
Hari ke-7	Data I	78	5	196	3	162	2
	Data II	4	20	15	9	85	2
	Data III	79	3	138	4	132	1
	Data IV	91	1	101	0	177	0
	Data V	47	0	42	0	113	2
Hari ke-28	Data I	89	2	53	5	51	1
	Data II	36	31	70	0	60	0
	Data III	141	2	124	3	131	1
	Data IV	134	0	68	0	86	0
	Data V	69	0	34	2	55	0
Hari ke-56	Data I	64	18	171	2	713	1
	Data II	7	10	32	12	44	1
	Data III	39	1	112	1	427	1
	Data IV	68	0	214	0	561	0
	Data V	34	2	114	0	315	0
Hari ke-84	Data I	202	0	196	0	471	0
	Data II	221	8	193	5	329	0
	Data III	151	4	92	4	128	0
	Data IV	212	1	132	0	412	0
	Data V	119	0	107	0	289	0

Hasil penelitian Tabel 1 dianalisis dengan program *software* SPSS ver 13. Uji normalitas Shapiro Wilk menghasilkan nilai kemaknaan (p) sebesar 0.001 ($p = 0.001$). Karena nilai $p < 0.05$, maka diambil kesimpulan sebaran jumlah liposom berdiameter ≤ 100 nm dan > 100 nm tidak berdistribusi normal. Langkah berikutnya adalah melakukan transformasi data untuk menormalkan distribusi data pada Tabel 1 yang tidak normal. Setelah dilakukan transformasi dengan Lg 10, uji normalitas Shapiro Wilk menghasilkan nilai kemaknaan (p) sebesar 0.008 untuk liposom yang berdiameter ≤ 100 nm, dan nilai kemaknaan (p) sebesar 0.007

untuk liposom yang berdiameter > 100 nm. Karena nilai $p > 0,05$, maka sebaran data pada liposom yang berdiameter ≤ 100 nm dan > 100 nm tidak terdistribusi normal. Oleh karena itu, analisis statistik yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji nonparametrik Kruskal-Wallis untuk mengetahui kelompok liposom yang paling stabil.



Gambar 4.2 Mikroskopik liposom pada hari ke-7 dengan perbesaran 400x

Berdasarkan uji nonparametrik Kruskal-Wallis, didapatkan nilai p sebesar 0.001 untuk liposom yang berdiameter ≤ 100 nm dan nilai p sebesar 0.05 untuk liposom yang berdiameter > 100 nm.

Tabel 4.2 Uji nonparametrik Kruskal Wallis dengan *software* SPSS 13

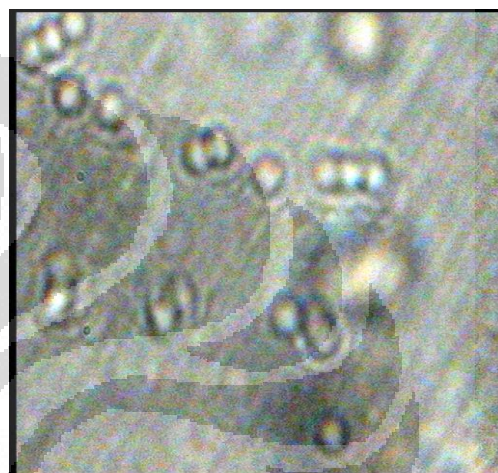
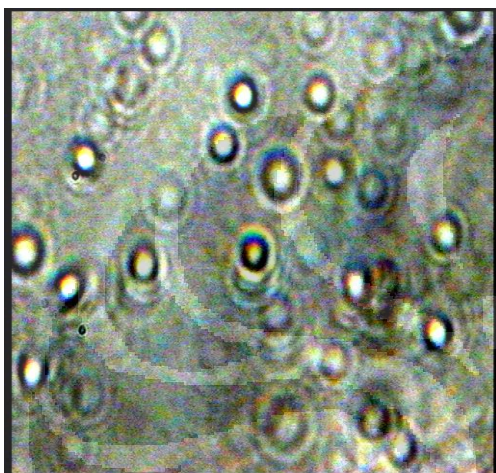
		Uji Kruskal Wallis	
		Nilai p	Analisis
Diameter liposom	≤ 100 nm	0.001	$p < 0.05$
	> 100 nm	0.031	$p < 0.05$

Sesuai dengan ketentuan, apabila nilai $p \geq 0.05$ berarti data yang didapat tidak berbeda bermakna. Karena nilai p pada liposom yang berdiameter ≤ 100 nm lebih kecil dari 0.05 maka data pada liposom berdiameter < 100 nm berbeda bermakna atau terdapat perbedaan jumlah liposom berdiameter < 100 nm antara dua

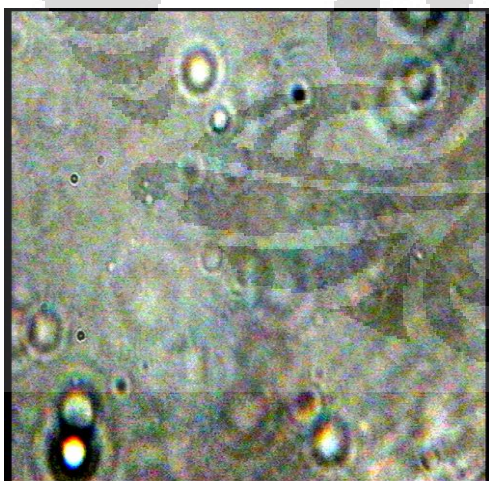
Universitas Indonesia

kelompok. Nilai p pada liposom yang berdiameter > 100 nm adalah 0.031 ($p < 0.05$) maka data pada liposom berdiameter > 100 nm terdapat perbedaan jumlah liposom berdiameter > 100 nm antara dua kelompok.

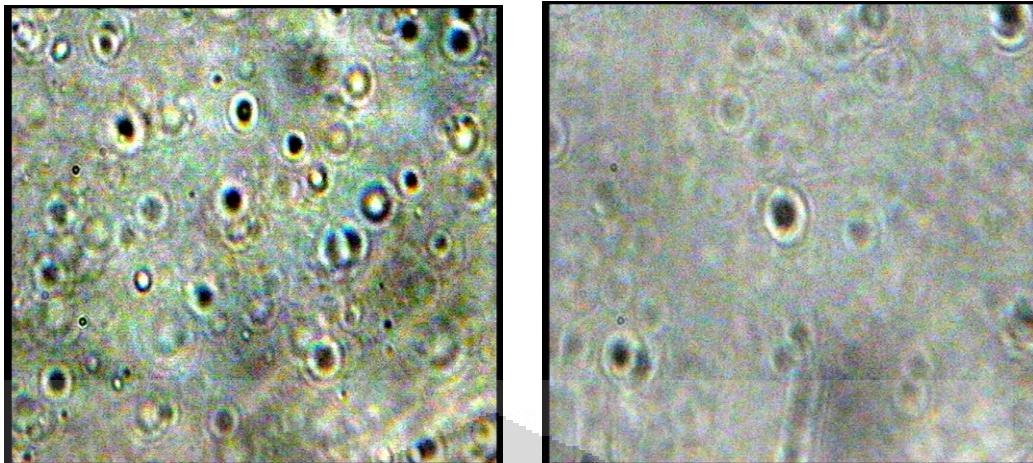
Untuk mengetahui pada hari ke berapa yang mempunyai perbedaan maka dapat dilanjutkan dengan melakukan analisis *post hoc*. Alat untuk melakukan analisis *post hoc* untuk uji Kruskal Wallis adalah dengan uji Mann Whitney.¹⁴



Gambar 4.3 Kontrol hari ke-1 perbesaran 400x Gambar 4.4 Kontrol bulan ke-3 perbesaran 400x



Gambar 4.5 Ekstrusi hari ke-1 perbesaran 400x Gambar 4.6 Ekstrusi bulan ke-3 perbesaran 400x



Gambar 4.7 Sonikasi hari ke-1 perbesaran 400x Gambar 4.8 Sonikasi bulan ke-3 perbesaran 400x

Pada hari ke-1 kelompok liposom dengan ekstrusi diameter ≤ 100 nm didapatkan perbedaan jumlah pada liposom ($p = 0.016$) dimana $p < 0.05$. Hal ini menunjukkan keadaan tidak stabil yaitu perbedaan jumlah liposom pada liposom dengan ekstrusi diameter ≤ 100 nm. Pada kelompok liposom dengan sonikasi diameter ≤ 100 nm didapatkan $p = 0.465$ menunjukkan tidak terdapat perbedaan jumlah liposom sehingga kelompok ini masih stabil. Pada kelompok liposom berdiameter > 100 nm secara ekstrusi dan sonikasi menunjukkan masing-masing $p = 0.461$ dan $p = 0.335$ ini menunjukkan kelompok liposom ini masih stabil ($p > 0.05$).

Pada hari ke-7 kelompok liposom dengan ekstrusi diameter ≤ 100 nm didapatkan perbedaan jumlah pada liposom ($p = 0.028$) dimana $p < 0.05$ menunjukkan keadaan tidak stabil. Pada kelompok liposom dengan sonikasi diameter ≤ 100 nm didapatkan $p = 0.175$ menunjukkan tidak terdapat perbedaan jumlah liposom sehingga kelompok ini masih stabil. Pada kelompok liposom berdiameter > 100 nm secara sonikasi menunjukkan $p = 0.746$ menunjukkan keadaan tidak terdapat perbedaan jumlah (stabil). Pada kelompok liposom ekstrusi > 100 nm didapatkan $p = 0.008$ ($p < 0.05$) ini menunjukkan terdapat perbedaan bermakna jumlah liposom (tidak stabil).

Tabel 4.3 Analisis *Post Hoc* liposom perlakuan ekstrusi dengan *software* SPSS 13

		Analisis Post-Hoc Liposom Ekstrusi				
		hari ke-1	hari ke-7	hari ke-28	hari ke-56	hari ke-84
Diameter liposom	≤ 100 nm	0.016	0.028	0.047	0.117	0.465
	> 100 nm	0.461	0.008	0.041	1	0.317

Tabel 4.4 Analisis *Post Hoc* liposom perlakuan sonikasi dengan *software* SPSS 13

		Analisis Post-Hoc Liposom sonikasi				
		hari ke-1	hari ke-7	hari ke-28	hari ke-56	hari ke-84
Diameter liposom	≤ 100 nm	0.465	0.175	0.602	0.251	0.917
	> 100 nm	0.335	0.746	0.665	0.829	0.738

Sampai pada hari ke 28 (bulan ke-1) kelompok liposom ekstrusi berdiameter ≤ 100 nm dan > 100 nm sudah tidak stabil ($p = 0.047$ dan $p = 0.041$) sedangkan pada kelompok liposom sonikasi berdiameter ≤ 100 nm dan > 100nm masih stabil ($p = 0.602$ dan $p = 0.665$).

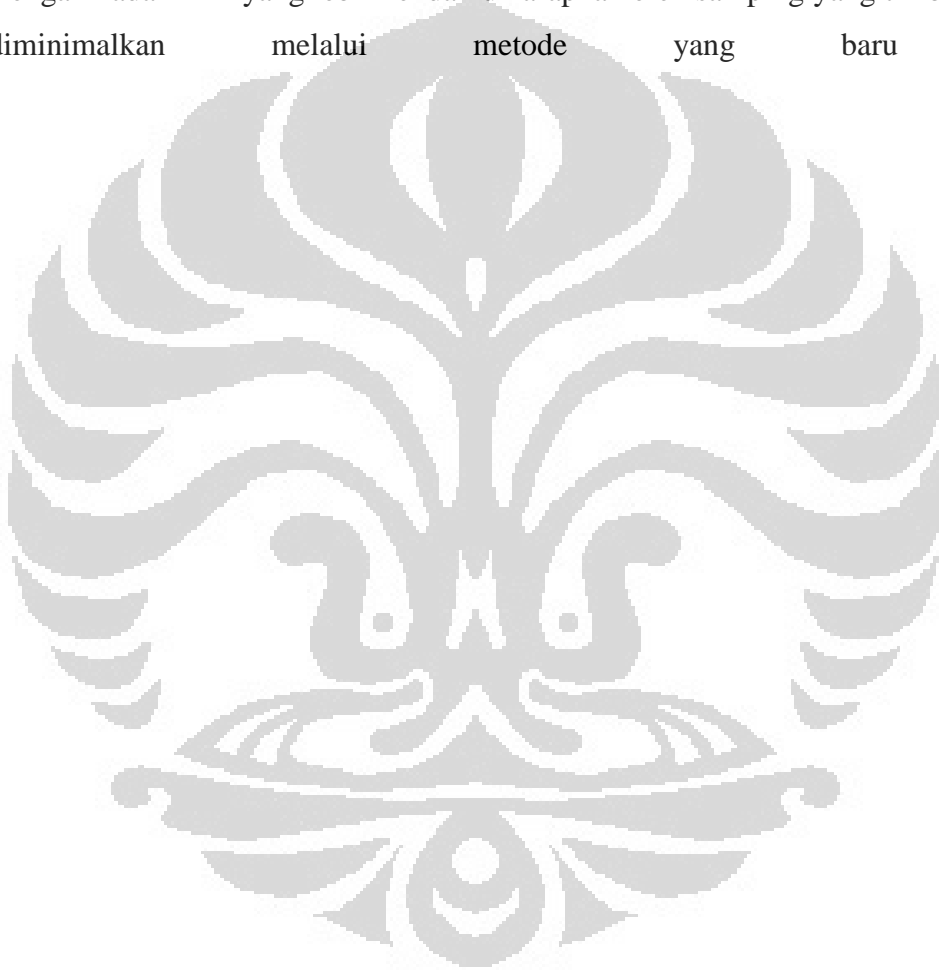
Pada hari ke 56 (bulan ke-2) kelompok liposom ekstrusi berdiameter ≤ 100 nm dan > 100 nm tidak stabil, tidak terdapat perbedaan dengan pengukuran sebelumnya sedangkan pada kelompok liposom sonikasi berdiameter ≤ 100 nm dan > 100 nm masih stabil ($p = 0.251$ dan $p = 0.829$).

Sampai pada hari ke-84 (bulan ke-3) kelompok liposom sonikasi berdiameter < 100 nm dan > 100 nm menunjukkan $p = 0.917$ dan $p = 0.738$ berarti pada kelompok-kelompok stabil yaitu tidak terdapat perbedaan jumlah liposom sedangkan pada kelompok ekstrusi berdiameter ≤ 100 nm dan > 100 nm tidak stabil.

Uji stabilitas fisik menunjukkan bahwa liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi, pada suhu kamar tetap stabil hingga hari ke-84 yaitu kelompok sonikasi diameter ≤ 100 nm dan sonikasi diameter > 100nm. Jumlah liposom EPC-TEL 2,5 tampak berkurang pada akhir bulan ke 3 pada kelompok liposom secara ekstrusi karena sebagian bergumpal, sedangkan diameter relatif tetap. Kelompok liposom

Universitas Indonesia

sonikasi ≤ 100 nm dan >100 nm lebih stabil banyak dipengaruhi berbagai faktor diantaranya dengan perlakuan sonikasi terbentuk membran vesikel yang lebih baik, ukuran yang memungkinkan ikatan kimia pada membran vesikel liposom lebih stabil. Pada penelitian ini digunakan deteksi liposom menggunakan zat fluoresens (*Quinacrine*) yang digunakan di Departemen Biologi FKUI karena lebih murah dan mudah didapat. Penelitian ini menggunakan TEL 2,5% dimana memiliki kadar yang lebih rendah dibandingkan penelitian Freisleben, dkk³². Dengan kadar TEL yang lebih rendah diharapkan efek samping yang timbul dapat diminimalkan melalui metode yang baru ini.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Pada liposom hasil ekstrusi diameter ≤ 100 nm terdapat perbedaan jumlah liposom (tidak stabil) pada hari ke-1 dengan $p = 0.016$ sedangkan pada liposom hasil ekstrusi diameter > 100 nm tidak stabil pada hari ke-7 dengan $p = 0.008$.
2. Pada liposom hasil sonikasi berdiameter ≤ 100 nm dan > 100 nm menunjukkan $p = 0.917$ dan $p = 0.738$ yaitu tidak ada perbedaan jumlah liposom atau stabil hingga hari ke- 84.

5.2. Saran

Penelitian terhadap liposom formulasi terbaru EPC-TEL 2,5 perlu dikembangkan lebih lanjut. Selain itu juga diperlukan alat yang lebih sensitif dalam mengukur diameter liposom, misalnya *particle sizer* atau program komputer *image plus*. Penelitian mengenai stabilitas liposom EPC-TEL 2,5 dari segi biologi dan kimia juga diperlukan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Davidson. Departemen of Biology Davidson Collage. Liposome method.
Available At:
<http://www.bio.davidson.edu/courses/GENOMICS/method/liposome.html> (15 November 2008).
2. Avanti Polar Lipid. Liposome preparation. Available at:
<http://www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes.html> (15 November 2008).
3. Lasic DD (ed). Liposomes as drug delivery system Liposomes from Physics ti Application. Elsevier Science publisher BV.1993.p.265-324.
4. Lasic DD. Liposomes Science and Medicine 1996 (may-June): 34-43.
5. 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.
6. Zubay GL(ed). Lipids and membranes. In : Biochemistry. 4th ed.Wm. C. Brown Publisher.1998:443-61.
7. 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.
8. New RRC (ed). Introduction. In Liposomes. A practical Approach. IRL Press 1990 :1-31
9. Lasic DD(ed) . Chemistry of Lipids and Liposomes. In : Liposomes from Physics to Application. Elsevier Science Publisher BV 1993: 1-42.
10. Stern J Freisleben HJ, Janku S, Ring K. Black lipid membrane of tetraether lipids from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim Biophys Acta* 1992;1128:227-36.
11. 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.
12. New RRC. Preparation of liposomes. In: New RRC(ed). *Liposomes*. A

Universitas Indonesia

- Practical approach*. IRL Press 1991; 33-104.
13. Lasic DD(ed). Preparation of liposomes.in: *Liposomes from physics to Application*. Elsevier Publisher BV 1993:63-107.
 14. Allen TM, Stuart DD. Liposome pharmacokinetics. Classical, sterically stabilized, cationic liposomes and immunoliposomes. In: *Liposomes Technology*. Gregoriadis G(ed). 1999:63-87.
 15. Lasic DD (ed). Site- Specific drug delivery. in *Liposomes from physics to application*. Elsevier Science Publisher BV 1993 : 441-71.
 16. Gregoriadis G. engineering liposomes for drug delivery : progress and problems. *TIBTECH* 1995;13:527-37.
 17. Lasic DD(ed). Liposomes in the treatment of infectious diseases. In *liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993:323-48.
 18. Bakker-Woudenberg IAJM. Liposomes in the treatment of parasitic, viral, fungal, and bacterial infections. *J Liposomes Research* 1995;5(1):169-91
 19. Mishina EV, Jusko WJ. Selected tissue distribution of liposomal methylprednisolone in rats. *Res Commun chem. Pathol Pharmacol* 1994b;84:47-52.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Mishina EV, Jusko WJ. Liposomal methyl-prednisolon in rats: dose-proportionality and chronic-dose pharmacokinetics/pharmacodynamic. *Pharm Res* 1996: 13 (1) : 141-5 (abstract).
 23. HandsFreise CE, Liu T, Hong K. The increased efficacy and decreased nephrotoxicity of cyclosporin liposome. *Transplantation* 1994;579 (6): 928-32.
 24. Lasic DD. Liposomes as immuno-adjuvants. In: *Liposomes from physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993 : 347-64.
 25. Daemen T, Regts J, Morselt H, Scherphof GL. The effect of liver macrophaes

- on colon carcinoma cells : evidence of macrophage activation. *Int J Immunopharmac* 1992;14(5):857-64.
26. Garcon NM, Six HR. Universal vaccine carrier. Liposomes that provide Tdependent help to weak antigens. *J Immunol* 1991; 146(11): 3697-3702.
27. Dickson D. Uk scientist test liposome gene therapy technique. *Nature* 1993, 365:4.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.

Lampiran

Perhitungan komposisi liposom EPC-TEL 2,5

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

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

$$= \frac{\text{gr} / \text{Mr}}{V}$$

$$10 \text{ mM} = \frac{\text{gr} / 780}{10 \text{ ml}}$$

$$\text{Gr (massa liposom)} = 10 \cdot 10^{-3} \cdot 780 \cdot 10 \cdot 10^{-3}$$

$$= 78 \cdot 10^{-3} \text{ gr}$$

$$= \mathbf{78 \text{ mg}}$$

2. TEL

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

Mr TEL = 1488,4

Dicari : massa TEL

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

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

$$= 1488,4 \times 2,5 = 3,721$$

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 :

$$\frac{18,6}{150} \times 1 \text{ ml} = 0,124 \text{ ml}$$

150

Dengan Sduit :

$$1 \text{ ml} = 80 \text{ IU}$$

$$0,124 \text{ ml TEL} = 9,92 \text{ IU}$$

$$= 10 \text{ IU}$$

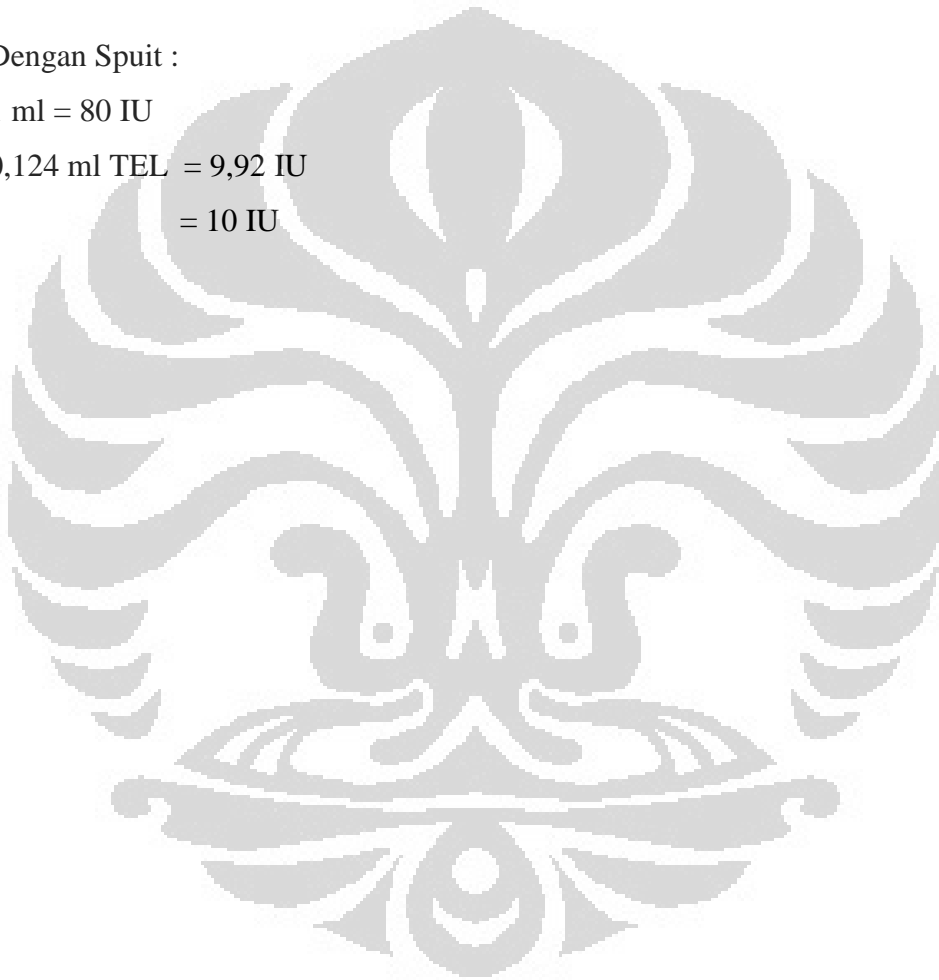
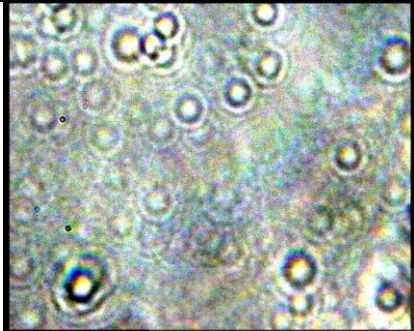
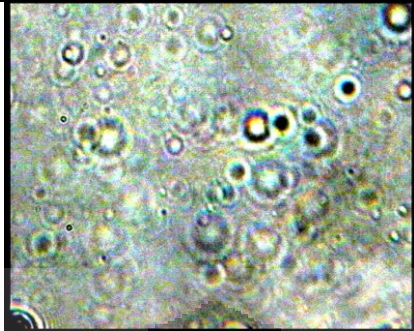
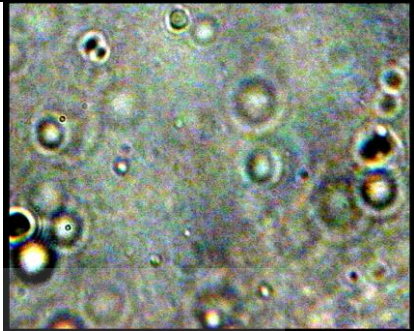
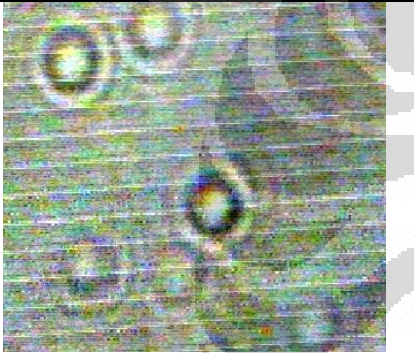
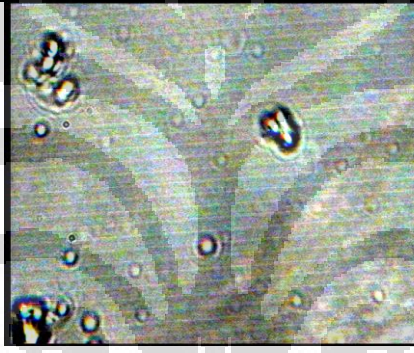
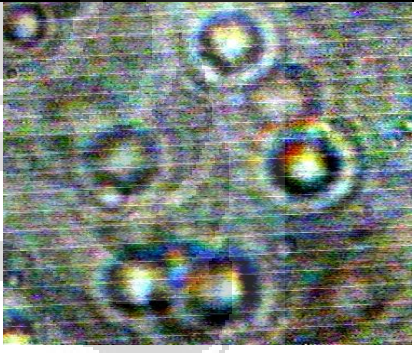
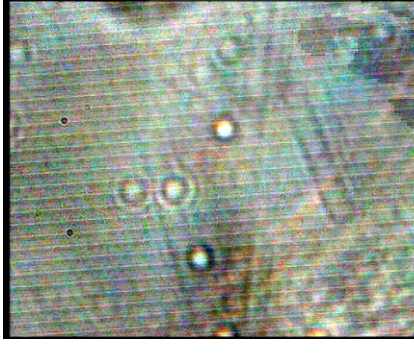
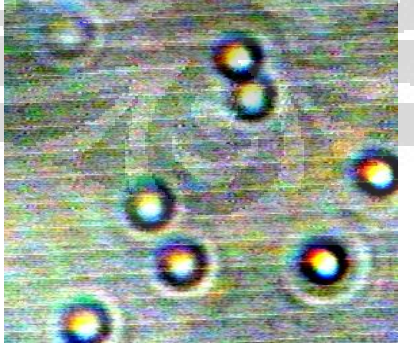
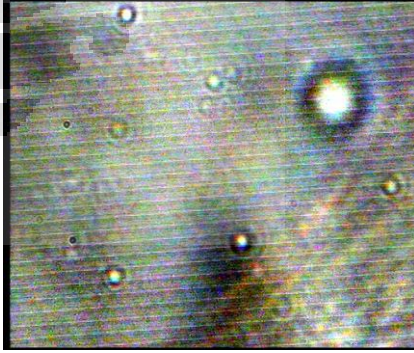
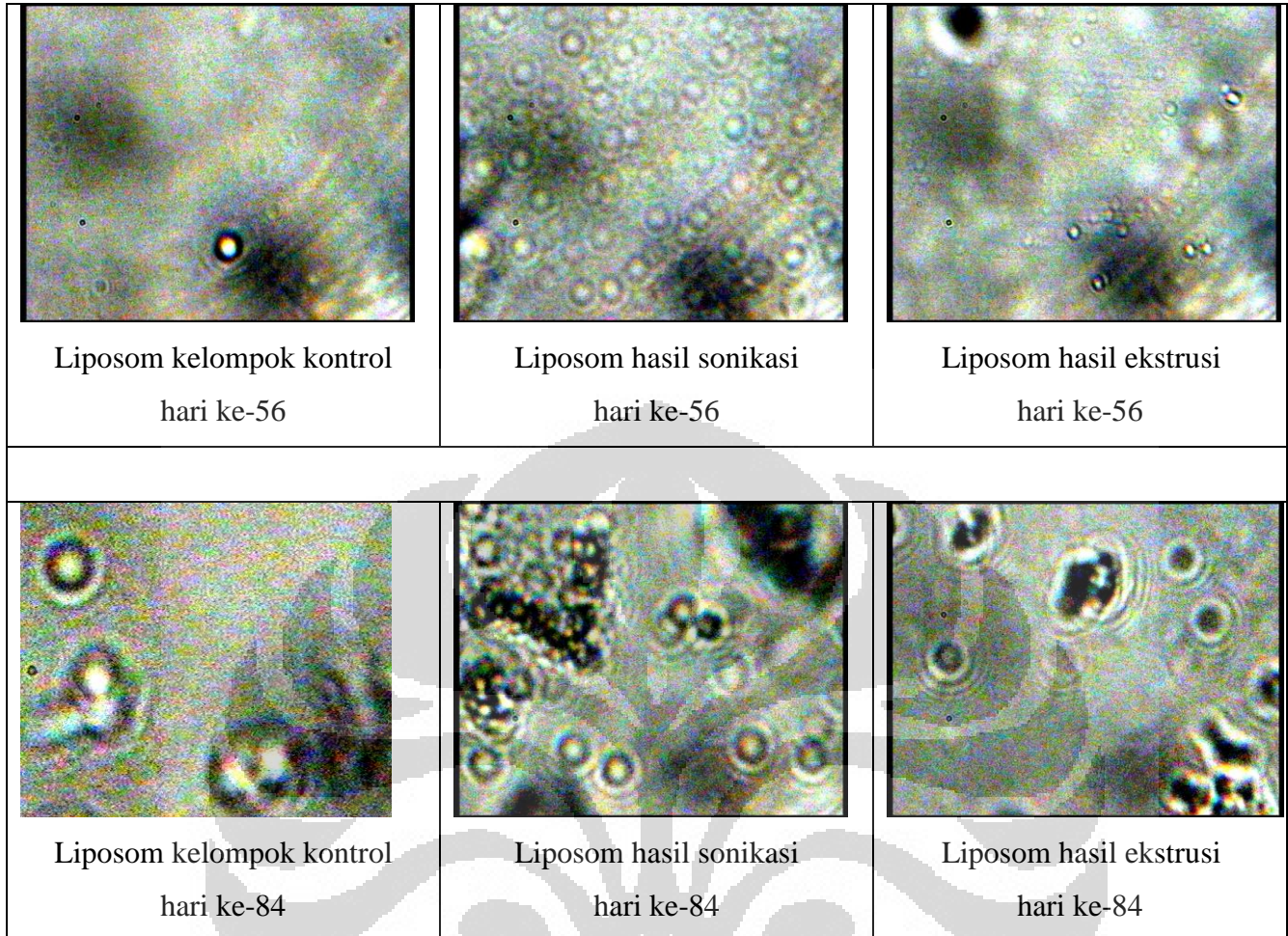


Foto-foto dalam pengamatan hari ke-0 sampai hari ke-84

		
<p>Liposom kelompok kontrol hari ke-0</p>	<p>Liposom hasil sonikasi hari ke-0</p>	<p>Liposom hasil ekstrusi hari ke-0</p>
		
<p>Liposom kelompok kontrol hari ke-7</p>	<p>Liposom hasil sonikasi hari ke-7</p>	<p>Liposom hasil ekstrusi hari ke-7</p>
		
<p>Liposom kelompok kontrol hari ke-28</p>	<p>Liposom hasil sonikasi hari ke-28</p>	<p>Liposom hasil ekstrusi hari ke-28</p>



CURICULUM VITAE

NAMA LENGKAP : Aditya Toga Sumondang Saragih
NAMA PANGGILAN : Aditya
NIM : 0105007012
TEMPAT/TGL. LAHIR : Jakarta, 23 April 1987
AGAMA : Kristen Protestan
STATUS PERNIKAHAN : Belum Menikah
PENDIDIKAN TERAKHIR : Tamat SMA
ALAMAT : Jl. Pertengahan No.59 Rt5/3 Cijantung
 13770 Jakarta Timur
E-MAIL : adityasaragih@gmail.com
NO. TELP : 02187781531 / 088210532348
HOBI : Membaca, Menulis, *blogging*

PENDIDIKAN :

1. TK Cinta Rakyat Pematang Siantar
2. SD Cinta Rakyat Pematang Siantar
3. SD Sukorame II Kediri Jawa Timur
4. SD Katholik XIV Manado Sulawesi Utara
5. SMP Negeri 1 Manado Sulawesi Utara
6. SMP Negeri 216 Jakarta Pusat
7. SMA Negeri 68 Jakarta Pusat
8. Fakultas Kedokteran Umum Universitas Indonesia

PRESTASI YANG PERNAH DIRAIH :

- 4 Juara I akademik matematika Tingkat kota Manado tahun 2001
- 5 Juara II Kuis Sang Juara SMU Binus Manado tahun 2001
- 6 Olimpiade Sains Tingkat Nasional bidang Fisika di Balikpapan September 2003
- 7 Juara I lomba IPTEK bidang studi Fisika Jakarta Pusat tahun 2003

Universitas Indonesia

- 8 Juara I Cerdas Cermat Iptek Nuklir Tingkat SMA se DKI Jakarta oleh BATAN tahun 2004
- 9 Peserta seleksi Apec Youth Science Festival (AYSF), Sunburst Youth Camp (SYC) dan Asean Student Exchange (ASE) tahun 2004

