

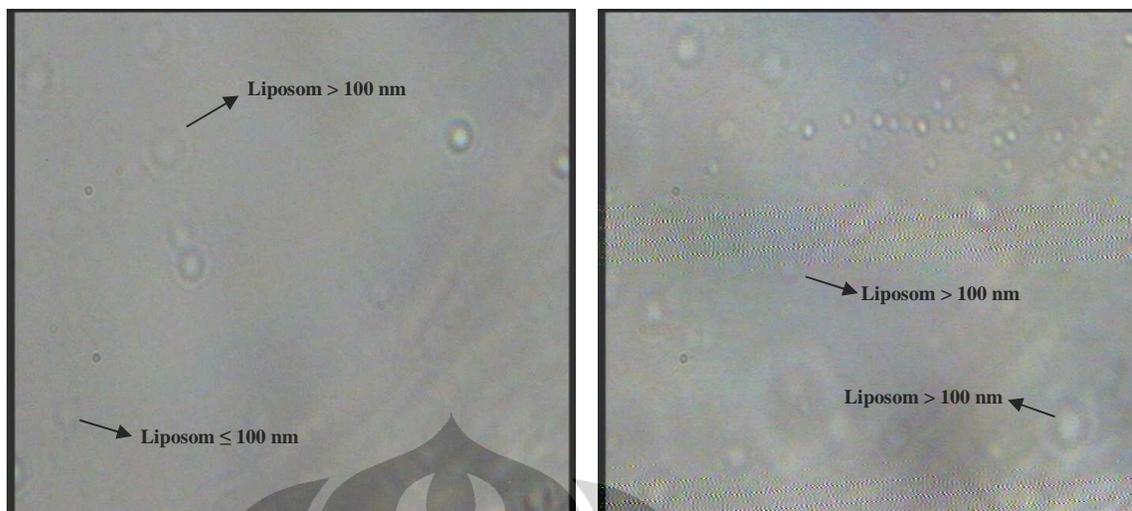
BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

EPC-TEL 2,5 yang dibuat dari pencampuran EPC dan TEL masih merupakan MLV, sehingga perlu dilakukan sonikasi dengan *bath sonicator* selama 60 menit pada campuran liposom untuk menghasilkan SUV dengan diameter 10-50 nm (rata-rata ≤ 100 nm). Data pada Tabel 1 merupakan data hasil penghitungan jumlah liposom pada hari ke-0, 7, 30, 60, dan 90. Berdasarkan definisi stabil, yaitu diameter liposom dan jumlah liposom yang > 100 nm tidak bertambah, maka hanya jumlah liposom yang > 100 nm yang akan dianalisis.

Tabel 1.
Hasil Pengukuran Liposom pada Waktu Penyimpanan
0, 7, 30, 60, dan 90 hari

Waktu Pengambilan Data		Kontrol		CaCl ₂ pH 7	
		Jumlah Liposom > 100 nm	Jumlah Liposom ≤ 100 nm	Jumlah Liposom > 100 nm	Jumlah Liposom ≤ 100 nm
Hari ke-0	Data I	9	299	9	266
	Data II	4	215	2	185
	Data III	39	227	42	243
	Rata-rata	17,3	247	17,7	231,3
Hari ke-7	Data I	0	224	0	363
	Data II	1	218	0	215
	Data III	0	209	1	189
	Rata-rata	0,3	217	0,3	255,7
Hari ke-30	Data I	115	287	7	231
	Data II	3	180	1	173
	Data III	12	286	19	228
	Rata-rata	43,3	251	9	210,7
Hari ke-60	Data I	9	349	0	386
	Data II	0	61	0	47
	Data III	21	231	1	225
	Rata-rata	10	213,7	0,3	219,3
Hari ke-90	Data I	17	269	65	472
	Data II	5	60	1	67
	Data III	14	161	27	370
	Rata-rata	12	163,3	31	303



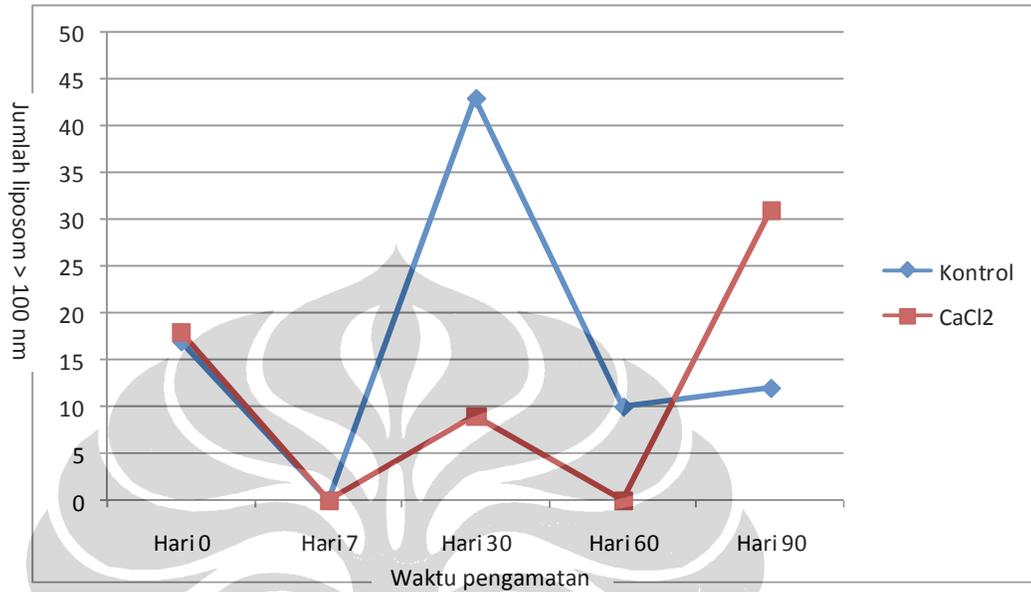
Gambar 12.

- (a) Foto Liposom EPC-TEL 2,5 dengan Pemaparan Larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 pada Hari ke-7
- (b) Foto Liposom EPC-TEL 2,5 dengan Pemaparan Larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 pada Hari ke-90

Gambar 12 memperlihatkan hasil penelitian ini. Gambar 12.(a) dan (b) merupakan hasil foto liposom dengan pemaparan larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 pada penyimpanan hari ke-7 dan hari ke-90. Jumlah liposom yang berukuran > 100 nm pada kedua gambar di atas cenderung tidak mengalami peningkatan. Foto-foto liposom yang diambil pada hari ke-0, 7, 30, 60, dan 90 lainnya dapat dilihat pada Lampiran 4.

Pada Gambar 13 dapat dilihat adanya fluktuasi yang cukup besar pada kelompok liposom >100 nm, baik pada kelompok liposom kontrol maupun liposom dengan pemaparan larutan CaCl_2 . Tampak pada hari ke-0 kedua kelompok liposom mengalami penurunan jumlah liposom sampai hari ke-7, dengan rata-rata jumlah liposom yang mengalami penurunan hampir sama. Pada hari ke-7, kedua kelompok liposom meningkat lagi jumlahnya sampai hari ke-30, tetapi kelompok liposom yang dipaparkan CaCl_2 tidak mengalami peningkatan yang signifikan dibanding kelompok liposom kontrol. Kemudian, kelompok liposom yang dipaparkan CaCl_2 mengalami penurunan lagi hingga mencapai angka 0 pada hari ke-60, dan meningkat secara drastis pada hari ke-

90. Kelompok kontrol juga mengalami penurunan jumlah liposom, dan meningkat lagi secara perlahan pada hari ke-90.



Gambar 13. Grafik Jumlah Liposom lebih dari 100 nm

Dari hasil uji statistik didapatkan nilai probabilitas (p) adalah 0,059 (dapat dilihat pada Lampiran 3). Jadi, dapat diartikan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara setiap kelompok perlakuan liposom. Tidak berbeda bermaknanya jumlah liposom yang berukuran > dari 100 nm ini, menunjukkan tidak terjadi penggumpalan pada partikel liposom (liposom stabil). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa liposom EPC-TEL 2,5 yang berdiameter >100 nm tetap stabil dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 hingga tiga bulan penyimpanan.

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

Keterbatasan alat menyebabkan penambahan diameter liposom, yang merupakan salah satu parameter kestabilan tidak dapat diukur dengan tepat. Komposisi liposom tidak dapat diamati, sehingga tidak dapat memastikan

apakah TEL tetap stabil (tidak terlepas) dari EPC walaupun terpapar garam dalam waktu penyimpanan 90 hari pada suhu 4°C.

4.2 Pembahasan

Pada penelitian ini parameter kestabilan yang diukur adalah tidak bertambahnya jumlah dan diameter liposom yang berukuran lebih dari 100 nm. Hal ini berarti, semakin banyak jumlah liposom yang berukuran lebih dari 100 nm, maka semakin tidak stabil liposom tersebut. Ketidakstabilan ini terjadi karena semakin banyak liposom yang berukuran kurang dari 100 nm yang mengalami penggumpalan.

Liposom yang berukuran kurang dari 100 nm juga dapat digunakan sebagai parameter kestabilan, yaitu dengan melihat jumlahnya yang tidak berkurang. Namun, penilaian terhadap liposom ≤ 100 nm relatif lebih sulit karena komposisi TEL pada membran liposom juga harus dinilai. Meskipun ukurannya tidak berubah, komposisi TEL bisa saja berubah, dan ini menandakan liposom tidak stabil. Dengan demikian, liposom ≤ 100 nm tidak digunakan sebagai parameter kestabilan dalam penelitian ini.

Pada dasarnya, perubahan fisik berupa hilangnya komponen penyusun membran, dalam hal ini termasuk TEL, dapat dianalisis menggunakan kromatografi. Prinsip kromatografi adalah membandingkan berat molekul partikel. Melalui kromatografi, dapat diketahui perubahan massa partikel liposom pada setiap hari pengamatan. Dengan begitu, berkurangnya massa liposom akibat hilangnya komponen membran, termasuk diantaranya adalah TEL, akan menandakan bahwa liposom tidak stabil sekalipun ukurannya tidak berubah pada seluruh pengamatan.

EPC (*Egg yolk Phosphatidyl-choline*) seringkali digunakan sebagai fosfolipid utama dalam liposom secara luas karena relatif lebih murah dibanding fosfolipid lain dan bersifat netral²⁷. EPC adalah bahan yang lazim digunakan untuk pembuatan liposom konvensional²². Liposom konvensional yang hanya terdiri atas lipid ester sangat rentan terhadap degradasi oksidatif. Peroksidasi lipid terjadi karena adanya rantai asil lemak yang tidak tersaturasi,

seperti pada fosfatidil kolin telur (*egg phosphatidyl choline/EPC*). Akibatnya, liposom yang disimpan dalam suspensi cairan dapat beragregasi.

Penambahan TEL ke dalam komposisi lipid dalam penelitian sebelumnya²⁰, dimaksudkan untuk membuktikan bahwa TEL juga dapat menstabilkan liposom konvensional selain jenis lipid lain yang sudah sering digunakan, antara lain kolesterol dan asam fosfatidat. Dipilihnya TEL sebagai penstabil membran karena TEL mempunyai struktur rangka lipid (*lipid skeleton*) yang tidak memiliki ikatan rangkap, yaitu berupa 2 gugus kepala polar (*polar head group*) dengan tebal membran sekitar 4 nm, sehingga diharapkan akan dapat berinkorporasi dengan membran liposom EPC yang menyerupai pasak dan menjadikannya resisten terhadap oksidasi.

Penelitian ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan Freisleben, HJ³⁷. Freisleben, HJ. telah melakukan penelitian mengenai kestabilan liposom menggunakan TEL dari *Thermoplasma acidophilum*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa liposom ini mempunyai kestabilan yang cukup tinggi. Penelitian dilakukan pada TEL murni dan perbandingan TEL dengan EPC yang cukup tinggi. Pada penelitian ini hanya digunakan TEL 2,5 mol % terhadap EPC.

Derivat TEL *Thermoplasma acidophilum*, dapat menstabilkan struktur liposom karena memiliki beberapa kelebihan seperti lipid archaeobacteria (TEL) bukan merupakan suatu ester gliserol, melainkan eter. Ikatan eter memberikan keuntungan dalam stabilitas membran dan mencegah kerusakan akibat proton yang tinggi. Selain ikatan eter, lipid ini tidak mengandung ikatan ganda, sehingga resistensi membran terhadap oksidasi meningkat serta gugus metil samping akan menambah efek fluiditas^{34,38}.

Sonikasi yang dilakukan pada liposom EPC-TEL 2,5 menghasilkan liposom dengan ukuran yang lebih kecil, yaitu sekitar 10-50 nm (SUV). Dengan ukuran yang lebih kecil, liposom dapat bersifat lebih stabil. Pada liposom dengan ukuran yang lebih besar, kemungkinan membran liposom yang satu berkontak dengan membran lainnya lebih besar, sehingga lebih memungkinkan untuk terjadinya penggumpalan.

Pada penelitian ini, larutan garam yang digunakan adalah CaCl_2 150 mOsm pH 7. Pemilihan larutan garam CaCl_2 karena ion Ca^{2+} dan Cl^- ini merupakan komponen elektrolit dalam tubuh manusia. Kalsium klorida juga dapat diinjeksikan sebagai terapi intravena untuk tatalaksana hipokalsemia⁴².

pH netral yang digunakan adalah untuk memperlambat proses hidrolisis yang terjadi sebab hidrolisis ikatan ester yang terdapat pada EPC berlangsung paling lambat pada nilai pH yang mendekati netral⁸. Dengan demikian, struktur liposom dapat diharapkan dapat bertahan dan tetap stabil.

Kendala dalam penelitian ini adalah pengukuran diameter liposom yang kurang akurat karena dilakukan secara manual. Akibatnya, data yang terkumpul bukan data numerik dan tidak dapat dianalisis menggunakan uji parametrik. Dengan demikian, hasil yang diperoleh kurang sensitif yang juga menjadi kekurangan dalam penelitian ini.

Penelitian tentang kestabilan liposom EPC-TEL ini, membuktikan bahwa liposom EPC-TEL cukup stabil dengan pemaparan larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 7 dalam penyimpanan 90 hari pada suhu 4°C , walaupun konsentrasi TEL yang digunakan sangat rendah, yaitu 2,5 mol %.