

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro* pada liposom formulasi baru EPC-TEL 2,5 yang telah disonikasi dengan perlakuan berupa pemaparan larutan  $\text{CaCl}_2$  150 mOsmol pH 7 dan penyimpanan pada  $4^{\circ}\text{C}$ . Pengamatan dilakukan pada hari 0, 7, 30, 60, dan 90.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di beberapa departemen di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Departemen tersebut antara lain Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran, Departemen Biokimia, Departemen Farmakologi, dan Departemen Fisika FKUI.

Liposom EPC-TEL 2,5 dibuat di laboratorium Ilmu Farmasi Kedokteran FKUI. Sonikasi dilakukan di laboratorium Farmakologi FKUI dengan Sonicator Branson 1510. Larutan  $\text{CaCl}_2$  150 mOsmol pH 7 dibuat di laboratorium Biokimia FKUI. Penghitungan jumlah dan diameter liposom dengan menggunakan mikroskop yang dihubungkan ke kamera Sony CCD-IRIS *color video camera*, pada gelas objek berskala Olympus, dilakukan di laboratorium Fisika FKUI.

Penelitian ini terdiri dari persiapan penelitian yang dilakukan dari bulan Maret sampai April 2007. Pengumpulan data penelitian berlangsung selama 3 bulan, April – Juli 2007, dan analisis serta pembuatan Laporan penelitian dilakukan mulai bulan Desember 2007 sampai April 2008.

#### **3.3 Parameter Kestabilan**

Parameter kestabilan yang diukur adalah tidak bertambahnya jumlah dan diameter liposom yang berukuran lebih dari 100 nm.

### 3.4 Bahan dan Alat

#### 3.4.1 Bahan

- Fosfatidilkolin dari kuning telur (*Egg yolk PhosphatidylCholine/EPC*) dari Lipoid®
- Tetraeter lipid (TEL) dari *Thermoplasma acidophilum* diperoleh dari IFB Halle Jerman
- Chloroform
- Ethanol 90%
- Warna liposom Quinakrin 0,05%
- Aquabides diperoleh dari laboratorium Ilmu Farmasi FKUI
- Larutan garam  $\text{CaCl}_2$  150 mOsmol pH 7

#### 3.4.2 Alat

- Rotavapor-vacuum pump-waterbath Büchi (Gambar 6)
- Sonicator Branson 1510 (Gambar 7)
- Neraca listrik Mettler AE-200
- Mikroskop cahaya Olympus
- Sony CCD-IRIS *color video camera*
- Hamilton Syringe 25  $\mu\text{L}$
- Gelas Objek berskala Olympus
- Kaca penutup
- Spuit 2,5 mL
- Botol kaca ukuran 20 mL
- Komputer yang terdapat program Win USB TV version 2.0



**Gambar 6.** Rotavapor-vacuum pump-waterbath Büchi



**Gambar 7.** Sonikator Branson 1510

### 3.5 Cara Kerja

#### 3.5.1 Pembuatan Larutan CaCl<sub>2</sub> 150 mOsm pH 7

- Di dalam gelas kimia, 333 mg CaCl<sub>2</sub> dicampurkan dengan aquabides 10 mL.
- pH larutan CaCl<sub>2</sub> diukur menggunakan pH meter. Jika pH larutan kurang dari 7, maka NaOH ditambahkan ke dalam larutan sampai didapatkan pH yang diinginkan. Jika pH larutan lebih dari 7, maka HCl ditambahkan sampai diperoleh pH yang diinginkan.
- Setelah pH 7 tercapai, tambahkan aquabides sampai volume larutan menjadi 20 mL sehingga diperoleh larutan CaCl<sub>2</sub> 150 mOsm pH 7.

#### 3.5.2 Pembuatan Liposom

- Membuat sediaan liposom:

1. Buchi Rotavapor dipanaskan, kemudian air dituang ke dalam waterbath dengan jumlah yang sesuai agar labu dapat terendam.
2. EPC dan TEL ditimbang (kadar TEL 2,5% dari mol EPC) sesuai dengan perhitungan yang terdapat pada Lampiran 1.
3. EPC dan TEL yang telah ditimbang dicampur, kemudian chloroform dan etanol ditambahkan dengan perbandingan 1:1 (masing-masing 5 ml).
4. Campuran EPC-TEL, Chloroform, Etanol dimasukkan ke dalam labu yang berisi *beads*.
5. Campuran EPC-TEL, Chloroform, Etanol yang terdapat didalam labu didispersi dengan Buchi Rotavapor selama 2 jam. Air di dalam waterbath harus bersuhu 40°C dan tekanan pada vakum dipertahankan 200 barr dan setelah kering tekanan pada vakum dipertahankan di bawah 50 barr. Proses pencampuran dan pengeringan liposom dapat diperlihatkan pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Proses pencampuran dan pengeringan liposom

6. Setelah campuran mengering, Aquades ditambahkan hingga volume mencapai 50 ml (sesuai dengan volume yang dibutuhkan), kemudian rotasi kembali sampai homogen. Gambar 9 memperlihatkan liposom yang telah mengering.



**Gambar 9.** Liposom yang telah mengering

- Menyiapkan liposom dalam berbagai jenis perlakuan:

1. Sediaan liposom disonikasi selama 15 menit sebanyak 4 kali dengan jeda 10 menit. Sonikasi dilakukan di Departemen Farmakologi FKUI dengan menggunakan sonicator Branson 1510. Proses sonikasi liposom terlihat pada Gambar 10.
2. Setelah diberikan perlakuan, *Quinakrin* sebanyak 0,195 mg ditambahkan pada semua sediaan liposom yang telah di buat.

3. Sediaan di bagi menjadi 2 kelompok sediaan liposom.
4. Kelompok sediaan liposom I sebagai kontrol, yaitu kelompok tanpa perlakuan.
5. Kelompok sediaan liposom II ditambahkan larutan  $\text{CaCl}_2$  150 mOsmol pH 7.



**Gambar 10.** Liposom yang sedang disonikasi

### 3.5.3. Penelitian

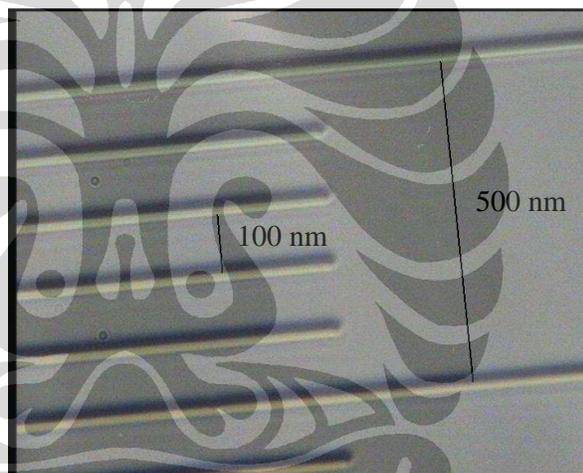
Pengambilan data tentang ukuran dan jumlah dari liposom yang telah di bagi menjadi 2 kelompok sediaan, dilakukan dengan cara :

1. Kaca preparat dibersihkan dengan alkohol 70% dan ditunggu hingga kering.
2. Mikroskop cahaya dihubungkan dengan kamera dan komputer.
3. Liposom yang telah dicampur dengan *Quinakrin* ditetaskan sebanyak 25  $\mu\text{L}$  pada preparat.
4. Sediaan ditutup dengan kaca penutup, kemudian dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 x (dapat disesuaikan).
5. Fokus mikroskop ditentukan, kemudian dicatat fokus yang didapat.
6. Diambil 10 foto liposom pada lapangan pandang yang berbeda dan video dengan durasi 15 detik. Simpan data yang didapat.
7. Langkah yang sama diulangi pada tiap sampel yang diuji.

Langkah 1-7 ini dilakukan pada hari 0, 7, 30, 60, dan 90. Pengukuran dan perhitungan jumlah liposom dilakukan setelah seluruh gambar pada tiap

waktu pengambilan terkumpul. Liposom diukur secara manual berdasarkan skala ukur yang terdapat pada kaca preparat berskala Olympus. Skala ukur yang digunakan pada penelitian ini diperlihatkan pada Gambar 11. Penentuan dua kategori pengukuran liposom, yaitu :  $\leq 100$  nm dan  $>100$  nm. Penghitungan jumlah liposom berdasarkan 2 kategori pengukuran juga dilakukan secara manual, yaitu dengan menggunakan mata secara subyektif.

Penghitungan jumlah liposom ini diulangi sebanyak 3 kali pada foto yang sama, sehingga menghasilkan 3 data. Pengulangan penghitungan ini dilakukan berdasarkan keputusan jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini. Penghitungan jumlah sampel dapat dilihat pada Lampiran 2. Cara penghitungan ini dilakukan karena keterbatasan alat yang digunakan.



**Gambar 11.** Garis ukur dengan skala 100 nm

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini merupakan data kategorial yang akan dianalisis dengan uji statistik nonparametrik Kruskal-Wallis, dengan batas kemaknaan  $p=0,05$ . Pengolahan data akan dilakukan dengan program SPSS ver. 11.5.