

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Pencampuran EPC dengan TEL dari *Thermoplasma acidophilum* sebanyak 2,5 mol % membentuk liposom EPC-TEL 2,5. Sonikasi dengan *bath sonicator* selama 60 menit pada campuran liposom menghasilkan SUV dengan diameter rata-rata ≤ 100 nm. Liposom yang telah ditambahkan larutan NaCl dan $MgCl_2$ diamati pada hari 0, 7, 30, 60, dan 90. Liposom yang diamati dikelompokkan berdasarkan diameter, ≤ 100 nm dan >100 nm, kemudian jumlah liposom dihitung. Hasil perhitungan jumlah liposom dapat dilihat pada Tabel 1.

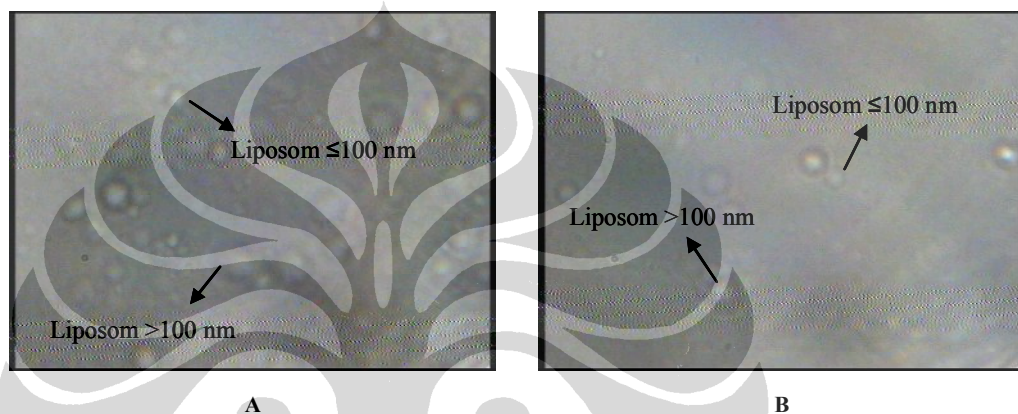
Tabel 1. Jumlah liposom pada tiga kelompok perlakuan dan lima waktu pengamatan

Perlakuan		NaCl		MgCl ₂		Kontrol	
		≤ 100 nm	>100 nm	≤ 100 nm	>100 nm	≤ 100 nm	>100 nm
Hari 0	Data I	219	1	195	20	299	9
	Data II	171	0	168	3	215	4
	Data III	268	17	273	20	227	39
	Rata-rata	219	6	212	14	247	17
Hari 7	Data I	252	20	198	13	224	0
	Data II	227	8	186	10	218	1
	Data III	209	9	169	15	209	0
	Rata-rata	229	12	184	13	217	0
Hari 30	Data I	317	39	165	34	287	115
	Data II	197	5	157	2	180	3
	Data III	244	36	240	47	286	12
	Rata-rata	253	27	187	28	251	43
Hari 60	Data I	662	2	45	0	349	9
	Data II	98	0	42	0	61	0
	Data III	479	9	331	0	231	21
	Rata-rata	413	4	139	0	214	10
Hari 90	Data I	232	91	130	43	269	17
	Data II	60	0	86	0	60	5
	Data III	216	67	135	34	161	14
	Rata-rata	169	53	117	26	163	12

Perhitungan dilakukan sebanyak 3 kali sehingga menghasilkan 3 nilai yakni Data I, Data II, dan Data III. Dari ketiga nilai ini, diambil rata-rata dan akan dilihat perubahannya pada setiap waktu pengamatan melalui grafik pada Gambar 18 dan 19.

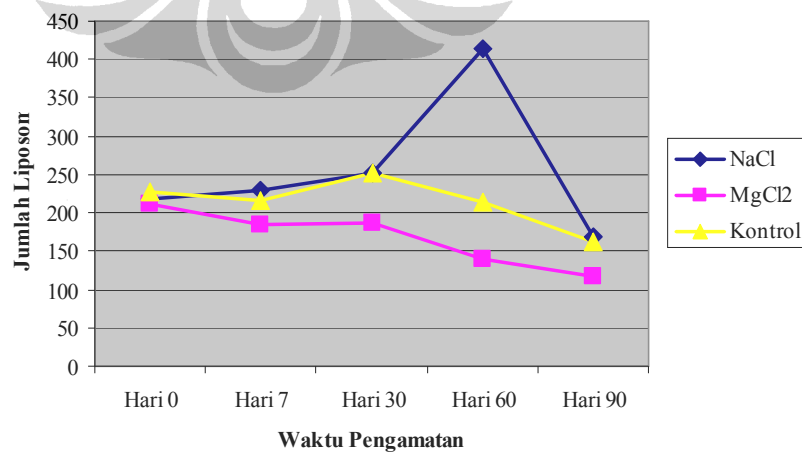
Gambar 14 A dan B merupakan salah satu hasil pengamatan pada liposom setelah pemaparan larutan NaCl dan MgCl₂ pada hari ke-90. Berdasarkan gambar ini, memang terdapat kecenderungan jumlah liposom pada hari terakhir pengamatan secara keseluruhan setelah penambahan larutan NaCl lebih banyak dibandingkan liposom setelah penambahan larutan MgCl₂.

Hasil pengamatan seluruh kelompok liposom pada setiap waktu pengamatan dapat dilihat pada Lampiran 4, 5, 6, 7, dan 8.



Gambar 17. Hasil pengamatan liposom Liposom EPC-TEL 2,5 pada Hari Ke-90 Setelah Pemaparan NaCl 150 mOsm pH 7 (A) dan MgCl₂ 150 mOsm pH 7 (B)

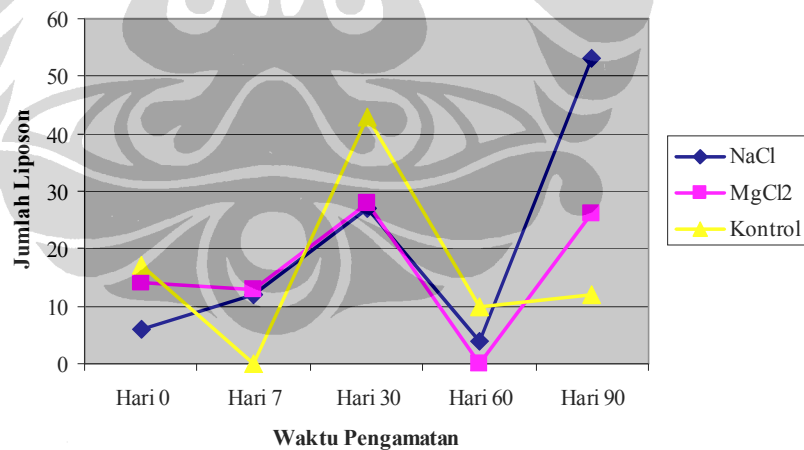
Pada Gambar 18, dapat dilihat bahwa liposom berukuran ≤100 nm dengan pemaparan NaCl 150 mOsm pH 7 memperlihatkan adanya fluktuasi.



Gambar 18. Grafik jumlah rata-rata liposom berdiameter ≤100 nm

Peningkatan jumlah partikel terjadi secara bertahap mulai dari hari 0 hingga hari 60, namun mengalami penurunan kembali pada hari 90 bahkan dalam jumlah yang lebih rendah daripada hari 0. Sebaliknya, pada pemaparan $MgCl_2$ 150 mOsm pH 7, jumlah liposom justru menunjukkan penurunan yang bertahap hingga hari terakhir pengamatan. Tidak jauh berbeda dengan kelompok $MgCl_2$, jumlah liposom kontrol juga menurun secara bertahap hingga hari 90 meskipun secara keseluruhan jumlahnya lebih banyak dibandingkan kelompok $MgCl_2$.

Pada kelompok liposom >100 nm dapat dilihat adanya fluktuasi yang cukup besar, baik pada kelompok liposom NaCl atau $MgCl_2$ maupun liposom kontrol, seperti yang terlihat pada Gambar 19. Ketiga kelompok mengalami penurunan jumlah partikel liposom pada hari ke-60 dan meningkat kembali pada hari ke-90. Namun, liposom yang ditambahkan $MgCl_2$ mengalami sedikit penurunan jumlah pada hari ke-7, kemudian meningkat kembali pada hari ke-30. Sedangkan liposom yang ditambahkan NaCl sejak awal sudah mengalami peningkatan sedikit demi sedikit.



Gambar 19. Grafik jumlah rata-rata liposom berdiameter >100 nm

Kelompok kontrol mengalami fluktuasi yang paling signifikan. Pada hari ke-7, rata-rata jumlah liposom bahkan mencapai nilai 0. Kemudian, pada hari-30

jumlah liposom mencapai nilai tertinggi pada seluruh waktu pengamatan dan turun lagi hingga lebih dari separuhnya pada hari ke-60.

Berdasarkan analisis uji non parametrik menggunakan metode Kruskal-Wallis, didapatkan nilai $p = 0,237$ pada kelompok NaCl dan $MgCl_2$ saja. Sedangkan pada perbandingan seluruh kelompok liposom, termasuk kelompok kontrol, diperoleh nilai $p = 0,226$. Kedua hasil analisis ini dapat dilihat pada Lampiran 3.

Sesuai hasil analisis tersebut, seluruh kelompok liposom >100 nm, baik setelah penambahan larutan NaCl maupun $MgCl_2$, tidak berbeda bermakna pada seluruh waktu pengamatan. Artinya, liposom tidak mengalami perubahan jumlah yang signifikan sejak hari 0 hingga hari 90 atau dengan kata lain, liposom stabil.

Begitu pula jika dibandingkan dengan kelompok liposom kontrol, tidak ada perbedaan yang signifikan dari segi kestabilan. Penambahan larutan NaCl dan $MgCl_2$ tidak mempengaruhi kestabilan liposom sama sekali pada seluruh waktu pengamatan.

4.2 Pembahasan

Liposom berdiameter >100 nm adalah liposom yang mengalami destabilisasi fisik seperti agregasi atau fusi. Agregasi dan fusi menyebabkan liposom yang pada awalnya berukuran ≤ 100 nm saling menyatu dengan liposom lain yang ada di sekitarnya, sehingga pada pengamatan berikutnya menjadi lebih besar atau berukuran >100 nm.

Dalam penelitian ini, liposom >100 nm digunakan sebagai parameter kestabilan dengan pemahaman bahwa semakin banyak liposom yang berdiameter >100 nm berarti semakin banyak destabilisasi yang terjadi atau dengan kata lain tidak stabil.

Pada dasarnya, liposom yang berukuran ≤ 100 nm juga bisa digunakan sebagai parameter kestabilan dengan melihat jumlahnya yang tidak berkurang. Namun, penilaian terhadap liposom ≤ 100 nm relatif lebih sulit karena komposisi TEL pada membran liposom juga harus dinilai. Sekalipun jumlah liposom ≤ 100 nm tidak berubah, liposom tidak dapat dikatakan stabil secara mutlak, sebab ada

faktor kestabilan lain yang perlu diperhatikan, yakni struktur dan komposisi TEL. Komposisi dan struktur TEL bisa saja berubah, dan ini menandakan liposom tidak stabil. Namun, oleh karena keterbatasan alat, uji komposisi dan struktur TEL tidak dapat dilakukan. Dengan demikian, liposom ≤ 100 nm tidak digunakan sebagai parameter kestabilan dalam penelitian ini.

Berbagai faktor memang dapat mempengaruhi kestabilan liposom, seperti komponen lipid penyusun, pH larutan, kekuatan ion, komposisi larutan penyangga, dan penyimpanan³⁸. Dalam penelitian ini, faktor yang ditambahkan untuk menguji kestabilan liposom adalah komponen lipid penyusun membran liposom, pH larutan, dan penyimpanan.

Penelitian ini menggunakan liposom konvensional EPC yang telah ditambahkan tetraeter lipid (TEL) 2,5 mol % menjadi liposom EPC-TEL 2,5. Pemilihan EPC lebih disebabkan oleh pertimbangan ekonomis, karena EPC lebih murah dibandingkan lipid bermuatan negatif seperti DPPC, meskipun lipid bermuatan negatif lebih stabil dibandingkan lipid bermuatan netral. Liposom yang pertama kali dikembangkan atau liposom konvensional belum bersifat menguntungkan karena stabilitasnya masih rendah dan waktu paruhnya yang singkat. Liposom yang dibentuk dari kombinasi EPC dan TEL terbukti menunjukkan perbaikan kestabilan dan dapat menutupi kekurangan liposom konvensional⁴⁸.

Penambahan TEL ke dalam komposisi lipid sebagai stabilisator membran karena struktur TEL yang mengandung 2 gugus kepala polar dan ketebalannya yang mencapai 4 nm diharapkan akan dapat berinkorporasi dengan membran liposom EPC menyerupai pasak⁴⁷. Dengan demikian, stabilitas membran diperkirakan akan lebih baik daripada stabilisator lainnya^{28,42,56,66,70}.

Di samping itu, berdasarkan studi oleh Freisleben dkk, TEL dapat memberikan muatan negatif pada permukaan liposom, sehingga kecenderungan liposom untuk beragregasi menjadi lebih rendah. TEL juga terbukti dapat mengurangi kerentanan liposom terhadap oksidasi pada keadaan tinggi proton⁵⁴.

Purwaningsih dkk berhasil membuktikan bahwa selain meningkatkan kestabilan liposom, TEL juga meningkatkan kemampuan liposom dalam menginkorporasikan obat. Liposom konvensional yang tersusun atas EPC saja

dapat menginkorporasikan obat pada hingga 70%. Penambahan TEL hasil ekstraksi *Sulfolobus acidocaldarius* sebagai stabilisator membran pada liposom EPC terbukti dapat meningkatkan inkorporasi obat pada membran liposom hingga 95%⁴⁷.

Dalam penelitian ini, TEL yang digunakan adalah TEL hasil ekstraksi dari *Thermoplasma acidophilum*. TEL dari *T.acidophilum* ini dipilih karena tetraeter lipid ini sangat stabil dari segi struktur fisik maupun kimiawi dibandingkan membran Archae lainnya^{71-72,75-76}. Lipid ini memiliki ikatan eter-gliserol dan rantai fitanil tersaturasi yang relatif lebih resisten terhadap oksidasi⁵⁸. Karakteristik ini membuat liposom yang mengandung TEL lebih sulit mengalami agregasi atau fusi. Selain itu, TEL aman digunakan sebagai komponen lipid dalam liposom karena toksisitas dan biodistribusinya telah teruji secara *in vivo*⁴⁰⁻⁴¹.

Berdasarkan beberapa penelitian, liposom EPC-TEL 2,5 ini terbukti dapat mengikat obat metil prednisolon palmitat lebih baik dan menunjukkan efek terapi imunologik serta terdistribusi dengan baik dalam organ dibandingkan metil prednisolon tanpa liposom^{39, 87-89}.

Berdasarkan alasan-alasan tersebut, tetraeter lipid merupakan pilihan yang baik untuk ditambahkan pada liposom konvensional guna meningkatkan kestabilannya dan juga meningkatkan kemampuan inkorporasi obat.

Dalam aplikasi di dunia kedokteran, digunakan liposom berukuran 80-200 nm⁴⁶. Ukuran liposom yang diperkecil dapat meningkatkan durasi dalam sirkulasi darah yang juga berarti meningkatkan efektivitas terapi. Di samping itu, liposom yang berukuran lebih kecil akan lebih mudah melewati pembuluh darah atau sinusoid sehingga lebih mudah mencapai target ekstrasvaskulatur seperti hati, limpa, dan bahkan tumor solid³⁸. Untuk mendapatkan ukuran yang demikian dapat dilakukan beberapa metode, salah satunya sonikasi menggunakan *bath sonicator*⁵¹. Meskipun demikian, dengan sonikasi kemungkinan terjadinya oksidasi lipid juga semakin besar, sehingga liposom menjadi cenderung tidak stabil⁴⁷.

Pada penelitian ini, larutan garam yang digunakan adalah NaCl 150 mOsm pH 7 dan MgCl₂ 150 mOsm pH 7. Kedua garam ini dipilih karena ion Na⁺ dan

Mg²⁺ merupakan ion penyusun elektrolit dan mineral makro dalam tubuh dengan kadar yang tinggi. Larutan NaCl juga lazim digunakan sebagai cairan infus⁴³⁻⁴⁴. Sementara itu, MgCl₂ merupakan larutan yang telah banyak digunakan untuk mengobati berbagai jenis penyakit, mulai dari penyakit pada saluran cerna, saluran pernapasan, hingga prevensi kanker. MgCl₂ juga berperan sebagai imunostimulan^{45,85}.

Tidak tertutup kemungkinan bahwa suatu saat liposom yang telah mengandung obat harus diberikan bersama cairan infus NaCl atau larutan MgCl₂ atau bahkan memerlukan penyimpanan dalam larutan tersebut. Oleh karena itu, pengaruh kedua larutan tersebut terhadap kestabilan liposom perlu diperhatikan dan diuji.

Pemilihan pH 7 disebabkan oleh bukti bahwa pH netral dapat meminimalisasi destabilisasi kimiawi. Fungsi pH netral adalah untuk memperlambat proses hidrolisis yang terjadi sebab hidrolisis ikatan ester yang terdapat pada EPC berlangsung paling lambat pada nilai pH yang mendekati netral⁵¹. Dengan begitu, struktur liposom dapat diharapkan dapat bertahan dan tetap stabil.

Penentuan suhu pada 4°C karena obat-obatan dalam bentuk injeksi dan cairan intravena atau infus seringkali harus disimpan pada fase pendingin atau pada suhu 4°C⁴⁷. Perlu diperhatikan bahwa suhu juga dapat mempengaruhi kestabilan liposom. Penyimpanan liposom pada suhu rendah, yakni sekitar 4°C, memungkinkan liposom untuk disimpan dalam jangka waktu tak terhingga tanpa mempengaruhi kestabilannya.

Walaupun demikian, pembekuan liposom hingga suhu -80°C dapat menyebabkan dehidrasi osmotik dan mempercepat agregasi liposom³⁸. Sebaliknya, suhu yang tinggi dapat meningkatkan probabilitas liposom untuk mengalami degradasi kimiawi atau oksidasi yang dapat mengakibatkan agregasi atau fusi²⁷. Pada suhu yang meningkat, rantai asam lemak akan mengalami perubahan konformasi yang menurunkan ketebalan membran. Akibatnya, membran menjadi kurang rapat dan kestabilannya menurun. Oleh karena itu, pertimbangan mengenai suhu penyimpanan liposom perlu dilakukan. Suhu

penyimpanan tidak boleh terlalu tinggi atau terlalu rendah agar liposom tetap stabil.

Melihat pengaruh suhu terhadap kestabilan liposom, maka perlu dilakukan pengujian terhadap stabilitas liposom yang dipengaruhi penambahan larutan garam dan penyimpanan pada suhu 4°C.

Pada akhirnya, liposom EPC-TEL 2,5 yang telah ditambahkan larutan NaCl dan MgCl₂ dan disimpan pada suhu 4°C selama 90 hari terbukti tidak mengalami destabilisasi yang signifikan berdasarkan parameter kestabilan yang digunakan. Semua faktor dan faktor yang diberikan yang mungkin menyebabkan ketidakstabilan ternyata tidak mempengaruhi kestabilan liposom. Kesimpulannya, liposom tetap stabil.

Kelemahan penelitian ini ada pada pengambilan data yang kurang akurat. Partikel liposom yang tidak terdistribusi dengan baik dalam botol kaca selama penyimpanan atau pada kaca preparat saat pengambilan foto dapat menimbulkan kerancuan pada jumlah liposom yang diperoleh.

Selain itu, fokus mikroskop yang tidak sama pada setiap pengambilan foto juga dapat menimbulkan keraguan. Perbedaan fokus pada setiap foto dan kemungkinan pengaruhnya terhadap distribusi ukuran liposom tidak dianalisis. Hal ini mungkin menimbulkan kerancuan pada hasil perhitungan jumlah liposom.

Kendala lain dalam penelitian ini adalah pengukuran diameter liposom yang subjektif dan 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.