

BAB III METODOLOGI

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro* pada liposom formulasi baru EPC-TEL 2,5 setelah sonikasi dan penambahan garam NaCl dan MgCl₂ 150 mOsm dengan pH 7 dan penyimpanan pada suhu 4°C selama 90 hari. Pengamatan objek dilakukan pada hari 0, 7, 30, 60, dan 90.

Penelitian dilakukan di empat laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, yaitu Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran, Departemen Biokimia, Departemen Farmakologi, dan Departemen Fisika Kedokteran.

Penelitian terdiri atas persiapan penelitian yang berlangsung sejak bulan Maret hingga April 2007, pengumpulan data hasil pengamatan mulai bulan April hingga Juli 2007, dan analisis data dilakukan pada bulan Desember 2007 hingga Maret 2008.

Pembuatan dan penyimpanan liposom EPC-TEL 2,5 dilakukan di laboratorium Ilmu Farmasi Kedokteran FKUI. Seluruh prosedur pembuatan liposom EPC-TEL 2,5 dilakukan menurut metode Purwaningsih dkk⁴⁷.

Sonikasi dilakukan di laboratorium Farmakologi FKUI untuk mendapatkan liposom SUV dengan ukuran <100 nm.

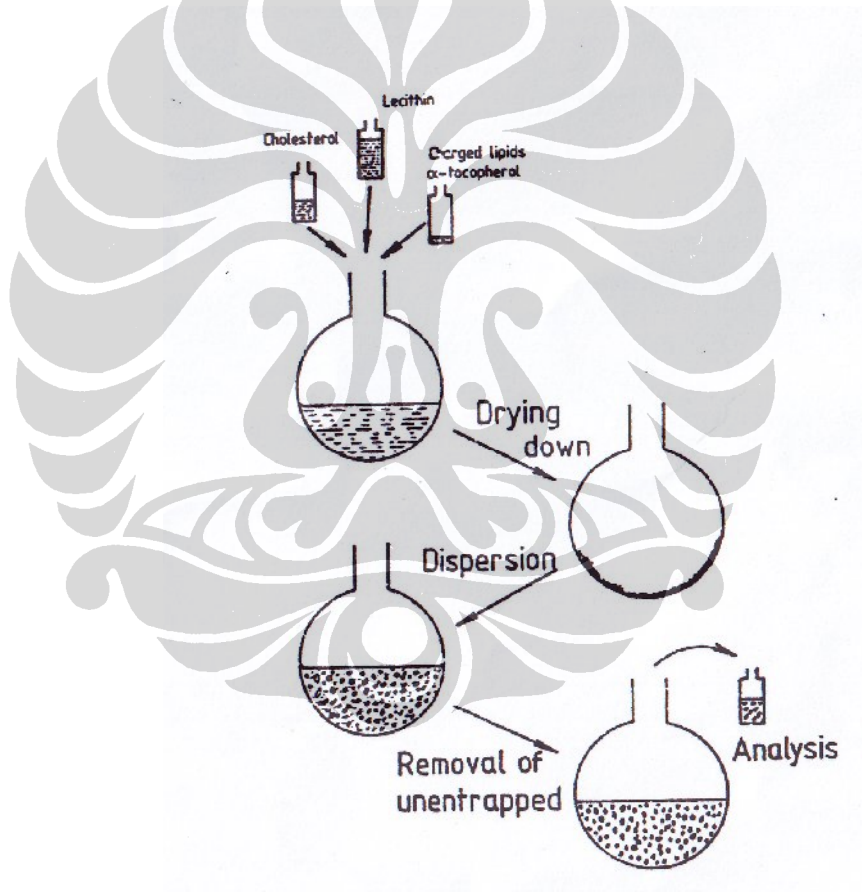
Liposom yang telah disonikasi dibagi menjadi tiga kelompok menurut perlakuannya:

1. Kelompok liposom kontrol (tanpa perlakuan)
2. Kelompok liposom setelah penambahan larutan NaCl
3. Kelompok liposom setelah penambahan larutan MgCl₂

Untuk mengamati partikel liposom digunakan mikroskop yang telah dihubungkan ke kamera dan komputer yang dilakukan di laboratorium Fisika FKUI. Setiap kelompok liposom diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran total 400 kali. Pada seluruh kelompok diambil 10 foto dari 10 lapang pandang dan 1 video berdurasi 15 detik. Jumlah partikel liposom dihitung secara manual menggunakan skala ukur dan dikelompokkan berdasarkan kategori yang telah ditetapkan: ≤ 100 nm dan > 100 nm. Partikel liposom berukuran ≤ 100 nm

dianggap stabil karena tidak mengalami penambahan ukuran setelah sonikasi dan penyimpanan dalam jangka waktu tertentu; oleh karenanya, digunakan sebagai parameter kestabilan. Sedangkan liposom dengan diameter >100 nm dianggap tidak stabil akibat agregasi atau fusi partikel liposom.

Secara sederhana, metode pembuatan liposom dapat dilihat pada Gambar 11. Seluruh komponen lipid yang digunakan dalam pembuatan liposom dimasukkan ke dalam labu. Dalam penelitian ini, lipid yang dicampurkan adalah EPC dan TEL. Campuran dikeringkan dan didispersi, salah satunya dengan cara rotasi. Campuran liposom yang terbentuk kemudian dianalisis atau diberi perlakuan sesuai dengan tujuan penelitian.



Gambar 11. Tahap-tahap umum dalam metode pembuatan liposom⁵¹

3.2 Bahan-bahan Kimia

Fosfatidilkolin dari kuning telur (Egg-yolk Phosphatidyl Choline=EPC) dari Lipoid[®]. Tetraeter lipid (TEL) dari *Thermoplasma acidophilum* diperoleh dari

IFB Halle Jerman. Chloroform, Etanol 70%, Quinacrin, aquabides diperoleh dari laboratorium Ilmu Farmasi FKUI. Larutan NaCl 150 mOsm pH 7 dan MgCl₂ 150 mOsm pH 7 didapat dari laboratorium Biokimia FKUI.

3.3 Peralatan

Rotavapor, pompa vakum, dan penangas air Büchi untuk preparasi liposom. EPC-TEL 2,5. Bath Titanium Sonicator tipe Branson 1510. Hamilton Syringe 25 µL untuk aplikasi sampel. Mikroskop Olympus yang terhubung dengan kamera Sony CCD-IRIS color video camera dan komputer dengan program Win USB TV ver.2.0 untuk observasi ukuran dan jumlah partikel liposom.

Alat-alat lain yang digunakan adalah neraca listrik Mettler AE-200, botol kaca 20 mL, spuit 2,5 mL, dan kaca preparat berskala Olympus.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Larutan NaCl dan MgCl₂ 150 mOsm pH 7

- Di dalam gelas kimia, 175,5 mg NaCl dicampurkan dengan aquabides 10 mL.
- Di dalam gelas kimia yang lain, 285 mg MgCl₂ dicampurkan dengan aquabides 10 mL. Perhitungan jumlah NaCl dan MgCl₂ dapat dilihat pada Lampiran 1.
- Untuk memperoleh pH 7, larutan NaOH dan HCl ditambahkan pada kedua larutan menggunakan pipet sambil diukur derajat keasamannya menggunakan pHmeter. Jika pH larutan kurang dari 7, NaOH ditambahkan ke dalam larutan sampai didapatkan pH yang diinginkan. Jika pH larutan lebih dari 7, HCl ditambahkan sampai diperoleh pH yang diinginkan.
- Setelah dicapai pH 7, tambahkan aquabides sampai volume larutan menjadi 20 mL sehingga diperoleh larutan NaCl 150 mOsm pH 7 dan larutan MgCl₂ 150 mOsm pH 7.

3.4.2 Preparasi Liposom EPC-TEL 2,5

Volume larutan liposom yang diperlukan adalah 50 mL. Untuk setiap 1 mL larutan dibutuhkan EPC sebanyak 10 mMol atau setara dengan 390 mg. TEL yang dibutuhkan sebanyak 2,5% dari mMol EPC atau sama dengan 0,25 mMol. Maka, sesuai perhitungan, TEL yang diperlukan adalah 18,605 mg. Jumlah EPC dan TEL tersebut diperoleh berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan sebelumnya. Perhitungan ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

- Rotavapor Büchi dipanaskan. Rotavapor, pompa vakum dan penangas air Büchi dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Rotavapor, pompa vakum, dan penangas air Büchi

- Air dituangkan ke dalam penangas air dengan jumlah yang sesuai agar labu terendam sebagian.
- EPC dan TEL yang diperlukan ditimbang.
- EPC dan TEL dicampurkan, kemudian Chloroform dan Etanol ditambahkan dengan perbandingan 1:1 (masing-masing 5 ml).
- Campuran EPC-TEL, Chloroform, Etanol dimasukkan ke dalam labu yang telah mengandung *beads*.
- Campuran didispersi dengan Büchi Rotavapor selama 2 jam. Air di dalam waterbath harus bersuhu 40°C dan tekanan pada vakum dipertahankan 200 bar dan setelah kering tekanan pada vakum dipertahankan di bawah 50 bar. Proses ini dapat ditunjukkan oleh Gambar 13.



Gambar 13. Proses dispersi menggunakan Büchi Rotavapor
Penangas air yang telah diisi air sehingga sebagian labu yang berisi liposom dan *beads* terendam

- Setelah campuran mengering, seperti pada Gambar 14, Aquades ditambahkan hingga volume mencapai 50 ml, kemudian rotasi kembali sampai homogen.



Gambar 14. Campuran liposom yang telah kering

- 15 mL campuran diambil dan beri label sonikasi.
- Campuran disonikasi menggunakan Bath Titanium Sonicator selama 100 menit di laboratorium Farmakologi FKUI. Proses sonikasi campuran liposom dapat dilihat pada Gambar 15.



A



B

Gambar 15. Proses sonikasi campuran liposom
Bath Titanium Sonicator (A) dan campuran liposom yang diletakkan dalam penyangga untuk disonikasi (B)

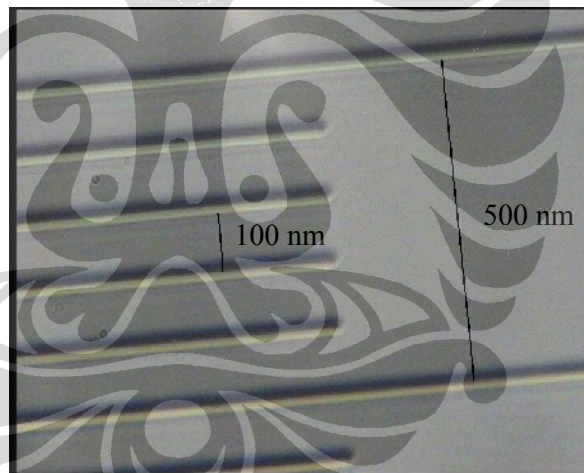
- Setelah disonikasi, Quinacrin sebanyak 0,195 mg ditambahkan ke dalam campuran liposom. Jumlah quinacrin sesuai dengan perhitungan sebelumnya yang dapat dilihat pada Lampiran 1.
- Campuran liposom diambil sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam botol kaca. campuran ke dalam 2 botol kaca. Botol kaca diberi label NaCl. Ulangi langkah yang sama pada botol kaca yang lain, tetapi diberi label MgCl₂.
- Larutan NaCl dan MgCl₂ ditambahkan ke dalam botol kaca berisi campuran liposom sesuai labelnya dengan perbandingan 1:1.

3.4.3 Pengukuran dan Perhitungan Liposom

Pengambilan gambar liposom dilakukan pada hari 0, 7, 30, 60, dan 90.

- Mikroskop yang telah terhubung dengan kamera dan komputer dipersiapkan.
- Kaca preparat untuk aplikasi sampel dibersihkan dengan alkohol 70% dan ditunggu hingga kering.
- 25 μ L liposom diteteskan pada kaca preparat.
- Sediaan ditutup dengan kaca penutup, kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

- Fokus mikroskop yang digunakan dicatat (dapat berbeda pada setiap sediaan).
- Diambil 10 foto pada lapang pandang yang berbeda dan video berdurasi 15 detik. Simpan data yang diperoleh.
- Langkah yang sama diulang pada kelompok liposom berikutnya.
Pengukuran dan perhitungan jumlah liposom dilakukan setelah seluruh gambar pada tiap waktu pengambilan terkumpul. Jumlah liposom dihitung berdasarkan kategori ukuran yang telah ditentukan sebelumnya: ≤ 100 nm dan >100 nm.
- Skala ukur 100 nm yang digunakan diperoleh dari kaca preparat berskala Olympus. Kaca preparat ini dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran total yang sama yakni 400x dan diambil fotonya, seperti yang ditunjukkan oleh gambar 16.



Gambar 16. Garis ukur dengan skala 100 nm

- Partikel liposom pada foto disesuaikan dengan skala dan dinilai apakah partikel liposom berukuran <100 nm, 100 nm, atau >100 nm. Partikel liposom berukuran <100 nm dan 100 nm masuk ke dalam kategori ≤ 100 nm, sedangkan partikel >100 nm masuk kategori >100 nm.
- Jumlah liposom dihitung dan dicatat menurut dua kategori tersebut.
- Langkah yang sama dilakukan pada setiap foto seluruh kelompok liposom.

- Perhitungan jumlah liposom ini diulangi sebanyak 3 kali pada foto yang sama, sehingga menghasilkan 3 data. Pengulangan perhitungan ini dilakukan berdasarkan keputusan jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini. Perhitungan jumlah sampel dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.5 Analisis Statistik

Data hasil perhitungan jumlah liposom berdasarkan diameter ≤ 100 nm dan > 100 nm merupakan data kategorial atau ordinal. Untuk pengujian terhadap hipotesis, digunakan uji nonparametrik metode Kruskal-Wallis karena sampel yang digunakan berjumlah lebih dari dua dan tidak berhubungan satu sama lain⁹⁰. Batas kemaknaan (α) adalah 5% atau $p < 0,05$ ⁹¹.

