

BAB IV

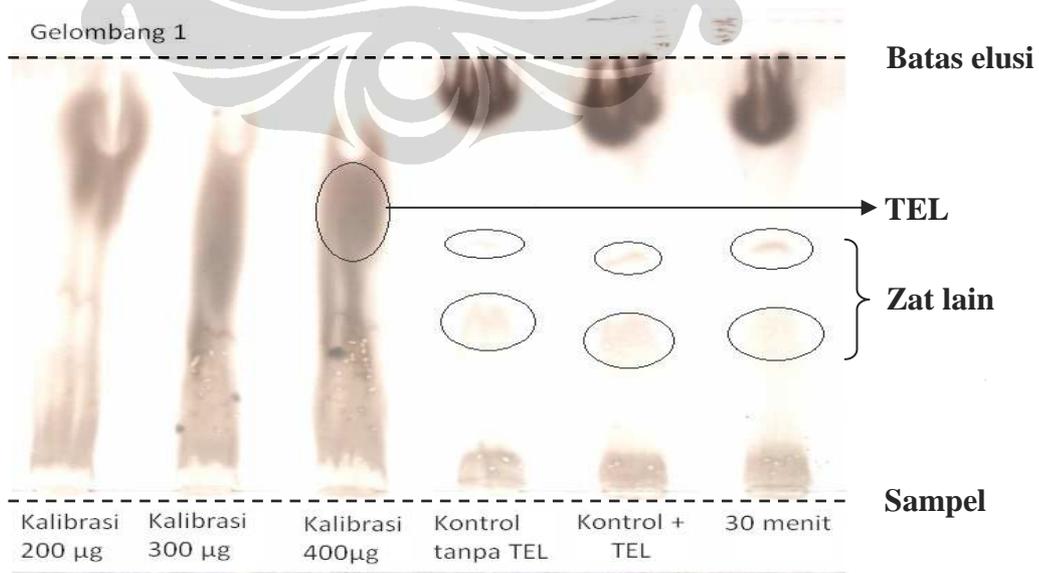
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

KLT dapat memberikan informasi mengenai kemurnian dan konsentrasi lipid. Jika senyawa tersebut murni maka hasil *running* akan berupa bercak tunggal. Phospholipid yang telah mengalami degradasi ekstensif dapat dilihat sebagai pulasan yang panjang, dengan ekor yang mengikuti sumbernya.⁴

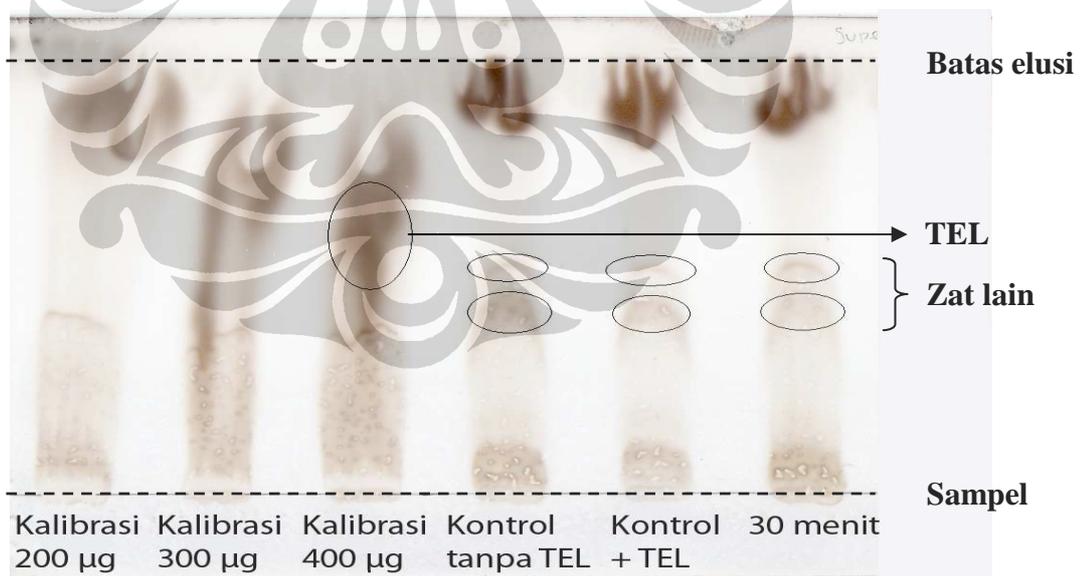
Degradasi TEL dinilai dengan cara membandingkan bercak TEL kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol + TEL pada lempeng KLT dengan asumsi TEL pada kelompok kontrol + TEL tidak terdegradasi. Suatu bercak pada kelompok perlakuan dapat diidentifikasi sebagai TEL apabila bercak tersebut memiliki *R_f* yang sama dengan *R_f* bercak TEL pada kontrol + TEL dan kalibrasi, tetapi bercak dengan *R_f* yang sama tidak terdapat pada kontrol tanpa TEL.

TEL pada kelompok perlakuan dinilai terdegradasi apabila pada lempeng KLT terdapat banyak bercak (*R_f*) dibanding dengan kontrol + TEL dan gambaran yang sama tidak terlihat pada kontrol tanpa TEL. Sedangkan TEL pada kelompok perlakuan dinilai tidak terdegradasi apabila pada kelompok perlakuan, kontrol + TEL, dan kalibrasi terdapat gambaran bercak yang sama.



Gambar 9. Hasil *running* KLT gelombang pertama

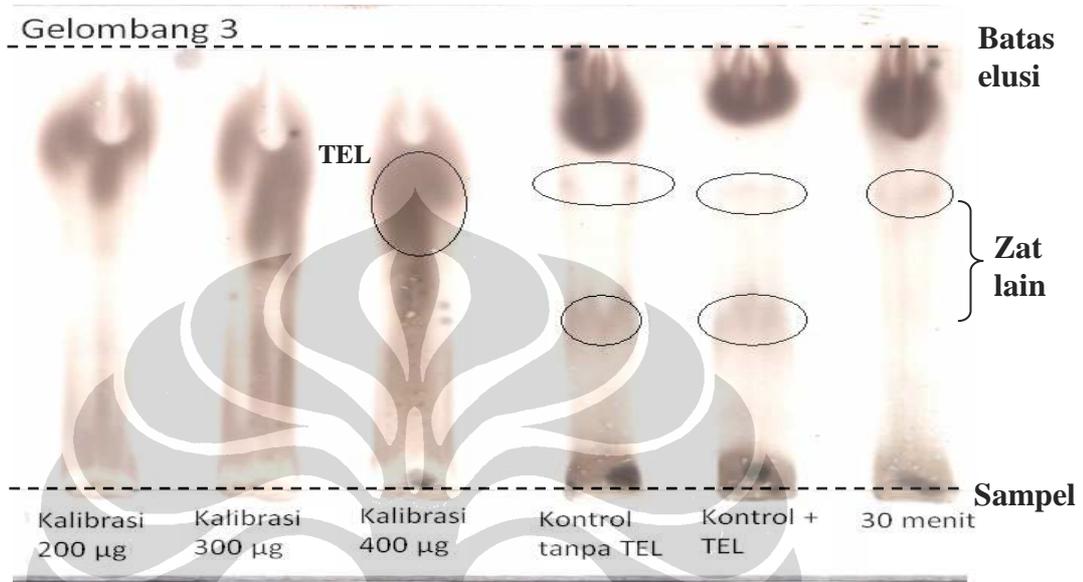
Gambar 7 memperlihatkan hasil *running* KLT untuk gelombang 1. Pada gambar 7 terlihat bahwa pada kalibrasi ditemukan bercak TEL yang berupa hapusan, hal ini sesuai dengan penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Purwaningsih⁷ bahwa TEL yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum* memberikan 9 bercak pada KLT sehingga gambarannya seperti hapusan. Pada kelompok perlakuan terdapat bercak dengan R_f yang kurang lebih sama dengan bercak pada kontrol + TEL. Tetapi, walaupun kedua bercak pada kelompok perlakuan dan kontrol + TEL memiliki R_f yang kurang lebih sama dengan R_f TEL pada kalibrasi, gambaran bercak tersebut tidak dapat menyimpulkan bahwa bercak tersebut merupakan TEL karena bercak dengan R_f yang sama juga ditemukan pada kelompok kontrol tanpa TEL. Hal ini menunjukkan bahwa kedua bercak pada kontrol + TEL dan kelompok perlakuan bukan bercak milik TEL melainkan bercak milik zat lain yang kemungkinan berasal dari membran sel hepar mencit. Dapat disimpulkan bahwa hasil *running* untuk gelombang 1 tidak memperlihatkan adanya bercak TEL pada kelompok perlakuan dan kontrol + TEL sehingga degradasi TEL pada kelompok perlakuan tidak dapat dinilai.



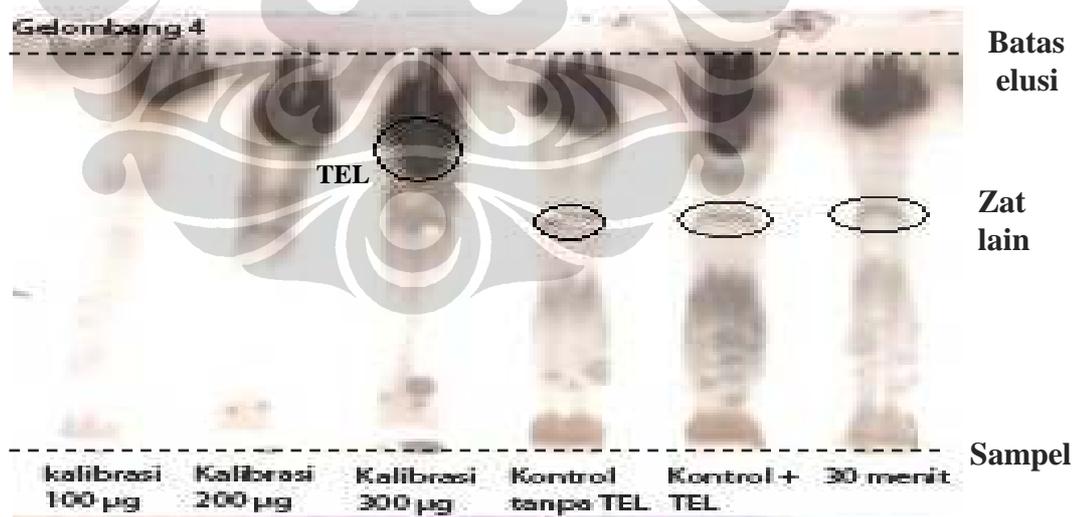
Gambar 10. Hasil *running* KLT gelombang kedua

Gambar 8, gambar 9, dan gambar 10 berturut-turut memperlihatkan hasil *running* KLT untuk gelombang 2, 3, dan 4. Pada gambar 8,9, dan 10; gambaran bercak yang terlihat pada lempeng KLT menyerupai gambaran bercak pada

gelombang 1, maka dapat disimpulkan bahwa hasil *running* untuk gelombang 8,9, dan 10 tidak memperlihatkan adanya bercak TEL pada kontrol + TEL dan kelompok perlakuan sehingga degradasi TEL pada kelompok perlakuan tidak dapat dinilai.



Gambar 11. Hasil *running* KLT ketiga



Gambar 12. Hasil *running* KLT gelombang keempat

4.2 Pembahasan

Pada penelitian yang dilakukan oleh Purwaningsih mengenai distribusi liposomal-metilprednisolon palmitat (L-MPLP) pada beberapa organ mencit setelah pemberian intra-peritoneal menunjukkan bahwa distribusi obat terbesar adalah pada hepar, diikuti organ lain dibandingkan kontrol.²¹ Liposom tersebut di atas memiliki formulasi EPC-TEL 2,5% yang kedalamnya diinkorporasikan metal prednisiolon palmitat. Distribusi L-MPLP pada organ yang terbukti lebih baik dibandingkan kontrol perlu diteliti lebih lanjut untuk mengetahui degradasi liposomnya, terutama TEL karena merupakan lipid hasil ekstraksi membran *Thermoplasma acidophilum* yang berfungsi untuk meningkatkan kestabilan liposom belum diketahui degradasinya dalam tubuh.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui degradasi TEL pada formulasi liposom EPC-TEL 2,5% di dalam tubuh 30 menit setelah injeksi intraperitoneal pada hepar mencit C3H dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Pada penelitian ini TEL yang digunakan sebagai penstabil membran liposom hanya 2,5% karena hingga saat ini belum ditemukan mekanisme pemecahan atau metabolisme secara *in vivo*.⁷ Penilaian hasil degradasi TEL diperoleh dari suspensi hepar karena pada penelitian yang dilakukan oleh Purwaningsih, distribusi liposom EPC-TEL 2,5% paling besar terdistribusi pada hepar dan mulai terdeteksi pada menit ke 30.²¹ Injeksi melalui intraperitoneal digunakan pada penelitian ini karena merupakan cara pemberian yang paling sering dipakai karena secara teknis mudah dilakukan, disamping itu karena banyaknya suplai darah di dalam rongga peritoneal laju absorpsi pada injeksi secara intraperitoneal hanya setengah atau seperempat kali lebih lambat dari injeksi intravena.¹⁵ Penggunaan mencit C3H pada penelitian ini karena mencit C3H telah menjadi standard penelitian di bidang biologi. Selain itu, mencit C3H dapat digunakan pada penelitian umum, penelitian kanker, penelitian sensorineural dll.¹⁵ Penggunaan KLT untuk deteksi dan pengukuran kadar hasil degradasi TEL karena KLT dapat mengidentifikasi lipid dan memberi informasi mengenai kemurnian dan konsentrasi lipid. Lipid murni akan meninggalkan titik tunggal pada fasa diam.⁴ Fosfolipid yang telah mengalami degradasi, akan terlihat banyak titik dengan R_f

yang berbeda-beda dibandingkan dengan fosfolipid yang belum mengalami degradasi yang akan terlihat sebagai satu titik.⁴

Dari hasil penelitian di atas, tidak terdapatnya bercak TEL pada lempeng KLT untuk kontrol + TEL dan kelompok perlakuan menyebabkan tidak terdapatnya data untuk variabel terikat, yaitu data mengenai terdegradasi atau tidaknya TEL (nominal). Hal ini mengakibatkan data durasi liposom pada mencit tidak dapat dihubungkan sehingga tidak dapat dilakukan analisis data dengan uji hipotesis serta degradasi TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 oleh hepar mencit tidak dapat ditentukan.

Tidak terdeteksinya bercak TEL yang diberikan pada saat ekstraksi hepar pada kontrol + TEL pada lempeng KLT diduga kemungkinan besar karena TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 telah terdegradasi oleh enzim-enzim yang dimiliki oleh hepar, namun hasil produk degradasi TEL tidak dapat terdeteksi oleh KLT. TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5% dapat disimpulkan sudah sampai ke hepar dalam waktu 30 menit diketahui dari penelitian yang dilakukan oleh Purwaningsih²¹, pada penelitian tersebut digunakan liposom EPC-TEL 2,5% yang diinkorporasikan metilprednisolon palmitat; pada penelitian tersebut disimpulkan bahwa penyuntikan L-MPLP secara intraperitoneal pada mencit menunjukkan bahwa pada menit ke-30 sudah ditemukan hasil metabolit MPLP pada hepar, hal ini menunjukkan bahwa liposom yang membawa obat MPLP juga sudah sampai ke hepar. Oleh karena itu tidak terdeteksinya TEL pada kelompok perlakuan diduga disebabkan juga karena telah terdegradasi oleh hepar.

Pertimbangan yang mendasari bahwa pada hepar kemungkinan terdapat enzim-enzim yang dapat mendegradasi TEL terlihat dari tidak terdapatnya bercak TEL pada kontrol + TEL pada lempeng KLT. Jika TEL pada kontrol + TEL tidak terdegradasi maka gambaran bercaknya seharusnya menyerupai gambaran bercak TEL pada kalibrasi. Pada kontrol + TEL, pemberian liposom EPC-TEL 2,5 pada saat ekstraksi hepar menyebabkan jumlah TEL yang mencapai hepar kurang lebih 100%. Telah diketahui bahwa hepar berfungsi dalam detoksifikasi dan degradasi sisa metabolisme oleh tubuh, hormon, obat-obatan, dan substansi asing;²² selain itu hepar merupakan organ utama yang dapat memetabolisme suatu substansi yang asing bagi tubuh atau xenobiotik sehingga pada hepar terdapat enzim yang

dapat memetabolisme xenobiotik dengan konsentrasi yang tinggi.⁹ Di lain pihak, TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 yang masuk ke dalam tubuh mencit merupakan lipid hasil ekstraksi dari *Thermoplasma acidophilum* sehingga dapat disebut juga xenobiotik. Oleh karena itu tidak terdeteksinya TEL yang dapat dipastikan telah mencapai hepar diduga karena TEL tersebut telah terdegradasi oleh enzim-enzim yang terkandung di dalam sel hepar. Dari penjelasan diatas dapat dikatakan bahwa TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 dimetabolisme dan didegradasi secara *in vivo* oleh enzim-enzim yang terdapat di dalam hepatosit sedangkan pada kontrol + TEL, TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 yang ditambahkan pada saat ekstraksi hepar didegradasi oleh enzim-enzim yang keluar dari hepatosit karena proses homogenasi.

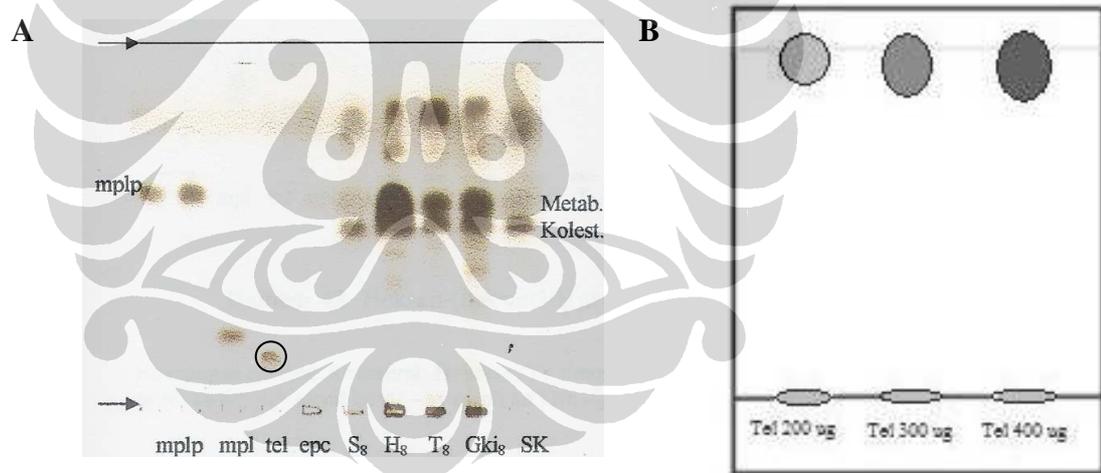
Hasil produk degradasi TEL tersebut di atas dapat dikatakan tidak terdeteksi oleh KLT. Hal ini didasari pada gambaran bercak yang sama antara kontrol tanpa TEL dengan kontrol + TEL dan kelompok perlakuan; dengan kata lain, bercak dengan R_f yang sama pada kontrol tanpa TEL, kontrol + TEL, dan kelompok perlakuan merupakan molekul lain yang mungkin berasal dari hepar.

Tidak terdeteksinya hasil produk degradasi TEL pada KLT dapat disebabkan antara lain, pertama, konsentrasi metabolit TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 terlalu kecil sehingga KLT tidak dapat mendeteksinya. KLT dapat mendeteksi bahan-bahan dengan konsentrasi 1 – 5 ng dengan absorpsi dan 50 – 100 pg dengan fluoresensi.²³ Jumlah hasil produk degradasi suatu substansi bergantung dari jumlah substansi yang akan didegradasi; semakin banyak jumlah substansi yang akan didegradasi semakin banyak pula jumlah hasil produk degradasinya. Pada kontrol + TEL, di dalam liposom EPC-TEL 2,5 yang diberikan pada hepar saat proses ekstraksi hepar terdapat 0,1 mmol TEL yang setara dengan 148,8 μg TEL. Namun pada saat aplikasi ke lempeng KLT, hasil ekstraksi hepar dilarutkan dengan 300 μL kloroform-metanol 2:1 dan hanya diambil 20 μL untuk selanjutnya diaplikasikan pada lempeng TLC. Hal ini tentunya mempengaruhi jumlah metabolit yang akan dipisahkan pada KLT. Dengan demikian, degradasi 148,8 μg TEL oleh hepar beserta prosedur standar yang dilakukan menghasilkan konsentrasi metabolit TEL yang kecil sehingga tidak dapat dideteksi oleh KLT. Pada kelompok perlakuan, jumlah TEL dalam

liposom EPC-TEL 2,5 yang diberikan secara intraperitoneal sama dengan jumlah TEL pada kontrol + TEL. Pada injeksi secara intraperitoneal, liposom EPC-TEL 2,5 yang masuk sebagian besar akan difagosit oleh makrofag lokal⁴ dan terdistribusi secara pasif ke organ lain yang kaya RES seperti limpa, paru-paru, sumsum tulang, darah, ginjal, dan dalam jumlah besar di hepar,⁴ hal ini menyebabkan jumlah TEL yang sampai ke hepar tidak utuh 148,8 µg seperti pada kontrol + TEL. Selain itu, pada saat ekstraksi hepar hanya diambil 200 mg hepar atau kurang lebih seperlima bagian hepar yang utuh sehingga TEL yang terambil untuk tahap ekstraksi hepar dapat dikatakan hanya seperlima dari TEL yang masuk ke hepar. Faktor pelarutan dan volume yang diaplikasikan pada saat aplikasi ke lempeng KLT juga berlaku pada kelompok perlakuan. Dengan demikian, kadar akhir metabolit TEL yang diaplikasikan pada lempeng KLT jauh lebih kecil dibandingkan dengan kadar metabolit TEL pada kontrol + TEL, oleh karena itu seperti pada kontrol + TEL bercak metabolit TEL juga tidak terdeteksi oleh KLT. Pada penelitian yang dilakukan Purwaningsih,⁷ pemberian liposom EPC-TEL 2,5 MPLP dengan berbagai komposisi yang mengandung TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* dengan konsentrasi yang lebih besar dibanding penelitian ini, yaitu 190 µg, 380 µg, dan 916 µg pada hepar kontrol juga tidak memberikan gambaran bercak metabolit TEL. Dengan kata lain untuk dapat melihat hasil produk degradasi TEL dapat dipikirkan untuk menambah konsentrasi TEL yang menuju hepar atau menggunakan alat deteksi yang lebih sensitif.

Kedua, ketidaksesuaian komposisi (kepolaran) eluen yang digunakan dalam KLT. Tidak sesuainya eluen yang digunakan membuat bercak metabolit TEL tidak terpisah dengan baik. Pada penelitian ini, lempeng KLT dan komposisi eluen yang digunakan merujuk pada Purwaningsih,²¹ yaitu kloroform-etanol 9 : 1. Pada uji coba dengan pemakaian eluen kloroform-etanol 9 : 1 tampak bercak TEL pada kalibrasi berada sangat dekat dengan batas akhir eluen sehingga menyulitkan pembacaan (R_f TEL mendekati 1). Selanjutnya dilakukan penambahan fraksi etanol pada eluen untuk menambahkan kepolaran eluen karena etanol bersifat lebih polar daripada kloroform, fase diam yang digunakan tetap gel silica yang bersifat polar. Penambahan etanol dilakukan hingga terbentuk eluen dengan

perbandingan kloroform-etanol 7 : 3, dan 6 : 4. Pada uji coba dengan komposisi kloroform-etanol 7 : 3, bercak TEL yang terbentuk masih terlalu dekat batas akhir eluen; sedangkan pada uji coba dengan eluen kloroform-etanol 6 : 4, bercak TEL yang terbentuk memiliki R_f 0,6 sehingga dianggap cukup memudahkan pembacaan. Kejadian di atas dapat terjadi karena TEL yang digunakan oleh Purwaningsih²¹ berasal dari *Sulfolobus acidocaldarius* yang memiliki kepolaran lebih tinggi dibanding dengan TEL dari *Thermoplasma acidophilum*; hal ini terlihat pada pemakaian eluen kloroform-etanol 9 : 1 yang kepolarannya lebih rendah dibandingkan dengan eluen kloroform-etanol 6 : 4. Hasil *running* eluen kloroform-etanol 9 : 1 menunjukkan bercak TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* memiliki R_f 0,16 dimana bercak TEL tersebut terlihat dengan jelas; sedangkan TEL dari *Thermoplasma acidophilum* memiliki R_f mendekati 1; perbandingan bercak TEL pada kedua penelitian digambarkan pada gambar 13. Dengan hasil tersebut dapat diketahui bahwa TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* lebih menyukai fase diam (lempeng KLT) yang bersifat



Gambar 13. Perbandingan bercak TEL pada penelitian Purwaningsih dengan penelitian ini yang menggunakan eluen kloroform-etanol 9:1. Gambar A menunjukkan bercak TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* yang digunakan pada penelitian Purwaningsih; terlihat bahwa R_f TEL tersebut dalam eluen kloroform-etanol 9:1 memiliki nilai 0,16. Gambar B menunjukkan TEL dari *Thermoplasma acidophilum* yang digunakan pada penelitian ini dalam eluen yang sama dimana bercak TEL terletak di dekat batas akhir elusi sehingga menyulitkan pembacaan nilai R_f .

dibandingkan TEL dari *Thermoplasma acidophilum* karena memiliki R_f lebih kecil. Oleh karena itu dilakukan penambahan sifat kepolaran pada eluen agar nilai R_f TEL dari *Thermoplasma acidophilum* turun sehingga bercak TEL mudah dibaca dengan cara mengurangi jumlah fraksi kloroform pada komposisi kloroform-etanol menjadi 7 : 3 dan 6 : 4, ternyata yang paling jelas dalam pembacaan bercak TEL adalah komposisi kloroform-etanol dengan perbandingan 6 : 4 dimana didapat nilai rata-rata R_f bercak TEL kalibrasi 0,6 sehingga selanjutnya dipakai eluen dengan komposisi tersebut. Pemilihan komposisi eluen yang dapat dilakukan berdasarkan struktur dan sifat fisikokimia substansi yang ingin dipisahkan sehingga komposisi eluen dapat dimodifikasi untuk mendapatkan hasil pemisahan yang baik.¹⁴ Sampai saat ini, produk standar metabolit TEL belum diketahui¹³ sehingga penulis tidak dapat memilih komposisi eluen berdasarkan sifat-sifat metabolit TEL. Jika struktur dan sifat fisikokimia substansi yang ingin dipisahkan belum diketahui, pemilihan komposisi eluen yang sesuai dapat dilakukan dengan cara mencoba pemisahan substansi tersebut dengan berbagai eluen hingga ditemukan eluen yang sesuai, namun penulis tidak dapat melakukannya karena jumlah bahan baku untuk pembuatan liposom yang tersedia terbatas.