

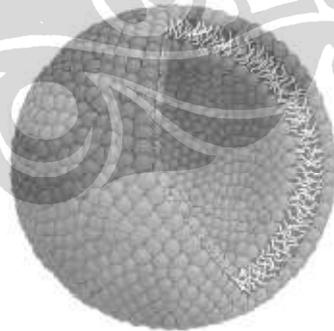
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Liposom sebagai Pembawa Obat

Liposom adalah struktur berbentuk vesikular dan bersifat koloidal yang tersusun dari lipid dwilapis.⁸ Liposom merupakan suatu vesikel yang dibentuk dengan cara mendispersikan berbagai macam lipid terutama fosfolipid, baik alami atau sintetik ke dalam media cair, sehingga terbentuk vesikel sferis yang terdiri dari molekul hidrofilik yang dikelilingi oleh molekul hidrofobik.^{2,3,9,10} Liposom dapat berupa membran unilamellar (terdapat satu lipid dwilapis yang mengelilingi inti hidrofilik) atau multilamellar (terdapat beberapa lipid dwilapis yang tersusun konsentris terhadap inti hidrofilik).^{2,3,8}

Liposom terbentuk secara spontan apabila molekul-molekul lipid terdispersi di dalam media cair, membentuk populasi yang diameternya dapat bervariasi dari puluhan nanometer hingga puluhan mikron. Liposom dapat dibuat sehingga sejumlah materi dapat dikemas baik dalam kompartemen cair maupun di dalam membrannya.⁴ Gambar skematik liposom dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Gambar skematik struktur liposom¹⁰

Nilai liposom sebagai model sistem membran didasarkan pada fakta bahwa membran liposom membentuk struktur dwilapis yang identik dengan lipid pada membran sel natural yang terdiri dari fosfolipid (model Singer dan Nicholson).⁴ Kesamaan antara liposom dan membran sel natural dapat

ditingkatkan dengan modifikasi kimiawi dari membran liposom dan dapat dimanfaatkan sebagai pembawa obat menuju sasaran tertentu dan modulator sistem imun. Sifat liposom yang sama dengan membran natural dengan jalur degradasi yang sama membuat liposom aman dan efektif untuk aplikasi medik.⁴

Liposom sebagai pembawa obat tidak hanya dapat menghantarkan obat dengan konsentrasi tinggi tetapi juga memungkinkan obat tertuju pada sel atau organ spesifik. Oleh karena itu penggunaan liposom sebagai pembawa obat dapat mengurangi efek samping obat karena distribusi obat ke sel atau organ lain dapat dikurangi. Liposom memiliki sifat-sifat yang unik karena karakter ampifilik dari lipid penyusunnya. Karakter ampifilik pada liposom, yaitu dwilapis hidrofobik dengan inti hidrofilik memungkinkan pelarutan atau pengasosiasian obat-obat hidrofobik dan hidrofilik. Susunan lipid ampifilik pada liposom membuatnya semakin mirip dengan membran biologi dan memiliki sifat-sifat yang memenuhi persyaratan sebagai pembawa obat (*drug carrier*) yang baik.¹⁰ Selain itu, mudahnya preparasi liposom dan banyaknya variasi dalam sifat fisik dan kimia liposom membuat liposom sebagai sistem pembawa obat yang atraktif.¹⁰

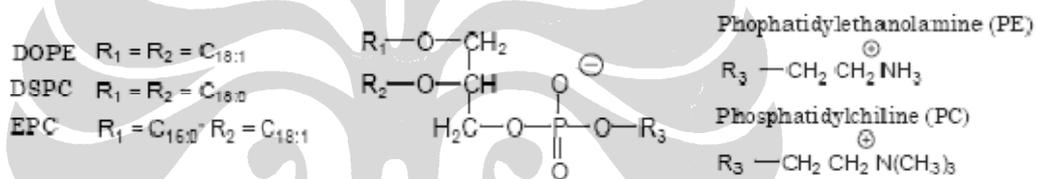
2.1.1. Unsur Pokok Kimiawi Penyusun Liposom

Variasi pada muatan dan susunan lipid dalam liposom dapat mempengaruhi fungsi liposom tersebut secara signifikan.⁹ Modifikasi fosfolipid dengan berbagai variasi dalam konfigurasi rantai asam lemak pada saat sintesis liposom dapat mempengaruhi afinitas liposom terhadap berbagai jaringan. Mengubah muatan pada liposom dapat mempengaruhi distribusinya dalam tubuh secara signifikan. Liposom dengan muatan negatif akan memasuki sel melalui fusi dengan sel; hal ini memungkinkan obat dapat dilepaskan ke sitoplasma. Liposom yang bermuatan netral masuk ke dalam sel melalui fagositosis; hal ini menyebabkan obat akan berinteraksi dengan enzim hidrolitik lisosom sel. Liposom dengan muatan netral dan positif akan dibersihkan lebih lambat dibandingkan dengan liposom dengan muatan negatif.

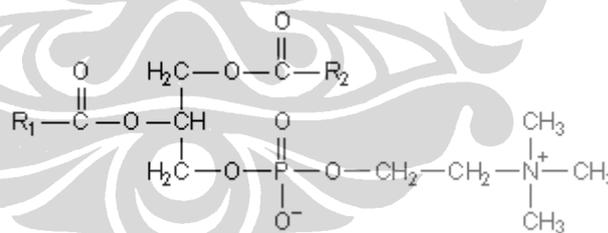
Liposom dapat dibuat dari bahan sintetik tertentu yang dipilih untuk meningkatkan efektivitas dan kestabilannya. Membran dwilapis yang stabil dapat dibuat dari berbagai macam lipid, seperti asam lemak atau derivat kolesterol. Unsur pokok zat kimia (lipid) yang digunakan untuk menyusun liposom nantinya

akan mempengaruhi kelarutan membran, muatan membran, dan permeabilitasnya.⁴ Karena komponen membran biologis yang paling utama adalah fosfolipid, maka fosfolipid merupakan bahan yang paling sering digunakan dalam pembuatan liposom.⁴

Fosfolipid merupakan komponen struktural membran biologis yang terutama terdiri atas fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, dan fosfatidilinositol. Bergantung pada jenis sel, lipid lain misalnya sfingomielin, kardiolipin, dan kolesterol dapat pula dijumpai pada membran sel.⁷ Lipid yang bersifat netral adalah sfingomielin dan fosfatidiletanolamin, sedangkan lipid yang bermuatan negatif fosfolipid asam misalnya dipalmitoil-fosfatidilgliserol (DPPG) dan dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC). Dengan teknik-teknik tertentu, masing-masing komponen tersebut saat ini sudah tersedia dalam bentuk sintetisnya.⁷



Gambar 2. Struktur beberapa fosfolipid-fosfatidil natural¹⁰



Gambar 3. Struktur fosfatidilkolin¹¹

Fosfolipid yang lazim digunakan pada pembuatan liposom konvensional adalah lesitin (fosfatidilkolin)¹⁰ dari kuning telur (*Egg-yolk Phosphatidylcholine = EPC*), kacang kedelai (*Soy-bean Phosphatidylcholine = SPC*), jaringan otak, atau yang dibuat secara sintetik. Fosfatidilkolin akan bersifat sebagai ion zwitter dalam semua pH yang relevan sehingga dapat membentuk struktur lamelar yang independen terhadap pH suatu larutan.¹⁰ Lipid bermuatan seperti fosfatidilserin atau fosfatidilgliserol seringkali ditambahkan sebagai stabilisator. Karena

fosfatidilkolin merupakan komponen fosfolipid utama membran sel dengan harga yang relatif rendah dibandingkan fosfolipid lain serta bermuatan netral, maka fosfatidil kolin dijadikan komponen utama liposom yang digunakan dalam aplikasi yang luas.^{4,10} Kolesterol dapat ditambahkan untuk memperbaiki stabilitas mekanis dan untuk menurunkan kebocoran senyawa aktif melalui membran.⁷ Lipid lain yang dapat digunakan sebagai stabilisator membran liposom, yang saat ini masih belum banyak digunakan adalah tetraeter lipid (TEL) dari membran sel Archaea, yaitu antara lain *Thermoplasma acidophilum* dan *Sulfolobus acidocalcarius*.⁷

2.1.2. Struktur Fisik Liposom

Liposom dapat dikarakteristikan melalui ukuran dan bentuknya. Liposom dapat berukuran mulai dari ukuran yang paling kecil secara teoritis (diameter ± 25 nm) hingga ukuran yang dapat dilihat melalui mikroskop cahaya, yaitu dengan diameter ≥ 1000 nm. Dari segi bentuk, liposom dapat berupa membran tunggal, membran dwilapis, atau dapat berupa lapisan membran multipel yang tersusun konsentris.

Karena liposom dengan ukuran yang berbeda memerlukan metode yang berbeda untuk membuatnya, dan aplikasi atau penggunaan liposom yang berbeda membutuhkan ukuran liposom yang khusus pula, maka klasifikasi liposom berdasarkan ukuran merupakan cara yang paling umum dipakai saat ini. Berikut ini merupakan klasifikasi liposom yang paling umum dipakai:⁴

I. *Small unilamellar vesicles (SUVs)*.

Liposom yang digolongkan pada kelompok ini adalah liposom dengan batas ukuran paling rendah yang masih mungkin pada vesikel fosfolipid. Batas ukuran yang terendah bervariasi dan bergantung pada kekuatan ionik media cair dengan komposisi lipid pada membran, ukurannya berkisar 15 nm untuk EPC dan 25 nm untuk DPPC.

II. *Intermediate-sized unilamellar vesicles (IUVs)*.

Liposom kelompok ini memiliki diameter diatas 100 nm

III. *Large unilamellar vesicles (LUVs)*.

Liposom pada kelompok ini memiliki diameter diatas 1000 nm

IV. *Multilamellar vesicles (MLVs)*.

Liposom pada kelompok ini biasanya terdiri dari populasi liposom dengan berbagai ukuran mulai dari 100 nm hingga 1000 nm, tiap vesikel biasanya terdiri dari lima atau lebih lamella yang tersusun konsentris. Vesikel yang tersusun dengan lamella yang sedikit disebut juga *oligo-lamellar liposome* atau *paucilamellar vesicles*.

Diameter atau ukuran liposom sangat ditentukan oleh beberapa hal, antara lain (1) jenis lipid dan kombinasinya, sebagai contoh liposom yang terbuat dari campuran EPC dan kolesterol berdiameter lebih besar (\pm 100-200 nm) dibandingkan dengan liposom dari EPC saja ($<$ 100 nm); (2) keseimbangan antara energi untuk membuka membran liposom, elastisitas kelengkungan liposom, dan jumlah energi yang tersebar; dan (3) cara pembuatan.⁷

Jumlah lapisan membran dan besar ukuran liposom ditentukan oleh cara pembuatannya. Liposom atau vesikel yang dibuat dengan cara *hand-shaken* akan berbentuk multilamellar dan berukuran besar (LMV = *Large Multilamellar Vesicle*). Ukuran liposom tersebut dapat diperkecil menjadi SUV dengan cara mengekstrusikannya melalui membran polikarbonat 100 nm atau dengan cara sonikasi menggunakan probe atau sonikasi di dalam air. Pembuatan liposom dengan cara dialisis terhadap *mixed-micelles* dengan detergen atau dengan cara *reverse phase evaporation*, *Freeze-thawing sonication*, perubahan pH dan penambahan kalsium akan dihasilkan LUV. Sonikasi terhadap LUV akan dihasilkan SUV. Hasil yang sama dapat diperoleh dengan cara lain yaitu dengan *Freeze-thawing*, *French pressure cell* yang bertekanan tinggi dan metode injeksi secara cepat menggunakan etanol dan eter.⁷

Untuk aplikasi kedokteran, digunakan liposom berukuran 80-200 nm dan harus memenuhi ketepatan persyaratan yang meliputi: konsentrasi lipid dan obat, distribusi ukuran liposom, persentase molekul obat bebas yang tidak terinkorporasi pada membran liposom, pH, osmolaritas, konduktivitas, adanya kemungkinan metabolit, endotoksin dan parameter lainnya.⁷

2.2. Perilaku Liposom di Dalam Tubuh

Liposom dapat dimasukkan dalam tubuh melalui berbagai cara, antara lain secara subkutan, intramuskular, oral, intravena, dan intraperitoneal. Liposom yang

diberikan secara subkutan dan intramuskular akan tertahan di tempat injeksinya dan secara perlahan akan masuk menuju nodus limfe melalui sistem limfe, dimana liposom tersebut diambil oleh makrofag dan sebagian lainnya akan berinteraksi secara langsung dengan limfosit. Sementara itu liposom yang diberikan secara oral hampir semuanya akan terdegradasi sebelum melepaskan sebagian besar isinya ke dalam sistem limfe di usus. Liposom yang diinjeksi secara intraperitoneal sebagian besar akan difagosit oleh makrofag yang berada di rongga tersebut, dan yang berasal dari sirkulasi sistemik.^{2,4}

Laju dan derajat pengambilan liposom oleh organ (*half life*) yang diberikan secara *in vivo* dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti komposisi membran dan ukuran liposom.⁵ Ukuran liposom berperan dalam menentukan tempat terjadinya interaksi dengan sel, sedangkan komposisi membran menentukan interaksi antara liposom dengan tipe sel tertentu, proses-proses lain seperti fusi, fagositosis, transpor sel ke sel.² Selain itu ukuran dan komposisi dari liposom menentukan jangka waktu liposom dapat bertahan di dalam sirkulasi darah;⁵ sebagai contoh, penambahan polietilen glikol (PEG) pada membran dwilapis liposom dapat meningkatkan waktu sirkulasi liposom dalam darah secara signifikan.⁸

Pada penyuntikan intravena, liposom ukuran kecil dapat melewati sinusoid hepar dan dengan cepat berinteraksi dengan hepatosit. Liposom ukuran sedang tertahan di dalam darah dan dapat bersirkulasi dalam waktu yang cukup lama. Liposom ukuran besar keluar lebih lambat dari sinusoid hepar dan secara cepat difagosit oleh sel Kuppfer di hepar. Liposom yang lebih besar lagi dikeluarkan dari sirkulasi ketika melewati paru-paru untuk pertama kalinya. Pada intinya variasi ini muncul karena interaksi liposom dan sel yang dimediasi oleh reseptor, pengambilan protein pada membran liposom dan heterogenitas ukuran dari populasi liposom yang tersedia.⁴

Keberhasilan liposom sebagai pembawa obat sangat ditentukan oleh berbagai faktor, salah satunya yaitu faktor yang berpengaruh terhadap bersihan darah. Liposom konvensional sangat dipengaruhi oleh ukuran liposom, muatan, fase transisi, dan ada atau tidak adanya kolesterol pada membran serta dosis lipid. Bersihan darah akan meningkat berbanding langsung dengan kecilnya liposom.

Bersihan darah akan menurun atau lebih lambat pada liposom yang tak bermuatan atau netral, yang mempunyai fase transisi tinggi (dwilapis lipid yang terikat erat satu sama lain), serta adanya kolesterol dalam membran yang lebih mempererat dwilapis lipid tersebut. Penurunan bersihan darah juga terjadi apabila lipid diberikan dalam dosis tinggi, yang menyebabkan saturasi (kejenuhan) dalam mekanisme ambilan (*uptake*) oleh sistem fagositik mononuklear (*Mononuclear Phagocytic Systems* = MPS).⁷

Dalam keadaan normal, ketika liposom yang terbuat dari lesitin (PC) diinjeksi ke dalam sirkulasi darah, liposom tersebut akan diambil dalam jumlah besar oleh organ-organ yang kaya akan RES. Sifat alamiah liposom yang secara pasif menuju sel fagositik pada RES membuat liposom terlokalisasi di organ-organ yang banyak mengandung RES, contohnya limpa, paru-paru, sumsum tulang, darah, ginjal, dan dalam jumlah besar di hepar.⁴

Pada hepar pengambilan liposom tergantung pada dosis dan saturasinya atau *blokade* dari liposom itu sendiri. Liposom berukuran besar akan menghambat pengambilan liposom yang berukuran besar. Liposom yang berukuran kecil akan menghambat pengambilan liposom yang berukuran kecil lainnya, selain itu liposom yang berukuran besar dapat mereduksi pengambilan liposom berukuran kecil, tetapi tidak sebaliknya.⁴

Liposom konvensional dengan konsentrasi di bawah kadar saturasinya dengan mudah akan ditangkap oleh sistem retikulum endotelial. Keberadaan kolesterol di dalam komposisi liposom dapat meningkatkan atau menurunkan ambilan obat oleh hepar dan limpa. Di dalam sirkulasi darah, liposom konvensional seringkali telah dirusak oleh lipoprotein atau terikat dengan opsonin sehingga mudah difagositosis oleh makrofag dan terjadi lisis sebelum mencapai sasaran. Lipoprotein, terutama HDL (*High Density Lipoprotein*), akan berikatan secara elektrostatis di antara dwilapis membran liposom sehingga kemudian akan terjadi disintegrasi membran.⁷

2.3. Interaksi Liposom dengan Sel

Liposom dapat berinteraksi dengan sel melalui beberapa cara yang menyebabkan komponen-komponen liposom bersatu, yaitu:⁴

2.3.1. Transfer intermembran

Transfer intermembran komponen-komponen lipid dapat terjadi ketika dua lapisan fosfolipid bertemu tanpa harus ada gangguan pada liposom dan integritas membran. Pada transfer intermembran, materi lipofilik yang ada pada membran liposom dapat masuk ke dalam membran yang berdekatan dengan membran lain sehingga jarak antara kedua membran ini cukup untuk mencegah materi yang akan ditansfer terpancung oleh fase cair (cairan interstitial). Transfer intermembran memungkinkan retensi sempurna isi liposom pada kompartemen cair

2.3.2. Contact Release

Cara ini dapat terjadi ketika membran sel dan membran liposom bertemu sehingga menyebabkan peningkatan permeabilitas membran liposom dan mungkin juga membran sel terhadap molekul larut air pada kompartemen cair liposom. Hal ini menyebabkan kebocoran (*leakage*) larutan berkonsentrasi tinggi dari kompartemen cair liposom langsung ke dalam sel.

Kedua cara diatas disebut *contact-mediated transfer mechanisms* dimana isi liposom dapat diinkorporasikan ke dalam sel tanpa terjadi internalisasi liposom itu sendiri. Kedua cara ini dapat memberikan jalan yang sangat efektif dalam memberikan isi liposom pada sel spesifik yang tidak aktif memfagositosis. Selain itu metode ini dapat bekerja baik pada keadaan dimana aliran dan turbulensi media di sekitar sel rendah dan keadaan dimana interaksi fisik antara liposom dan sel diperkuat oleh ikatan receptor atau ligand antara kedua membran.⁴

2.3.3. Adsorpsi

Adsorpsi liposom dalam permukaan sel dapat terjadi dengan sedikit atau tanpa internalisasi, baik pada komponen lipid maupun komponen cair. Adsorpsi dapat terjadi karena gaya tarik dan reseptor spesifik yang peka terhadap ligan di membran vesikel (liposom). Dapat dikatakan, adsorpsi liposom dapat terjadi melalui ikatan protein permukaan spesifik pada sel. Adsorpsi merupakan syarat esensial untuk terjadinya ingesti liposom oleh sel, namun faktor yang menentukan terjadi atau tidaknya ingesti yang diikuti pinositosis atau fagositosis masih belum sepenuhnya dimengerti.

2.3.4. Fusi

Interaksi antara liposom dan membran yang berjarak dekat satu sama lain dapat mengakibatkan fusi, yaitu penyatuan sempurna lipid pada liposom dengan membran plasma sel, sehingga isi liposom terpajan langsung dengan sitoplasma sel. Pada liposom multilamelar, membran interna liposom yang masih intak akan bertemu dengan sitoplasma sel pejamu sehingga memungkinkan interaksi yang sama antara liposom dengan organel subselular.

2.3.5. Fagositosis

Pengambilan liposom melalui fagositosis terjadi oleh beberapa tipe sel tertentu contohnya makrofag. Fagositosis terjadi melalui adsorpsi liposom yang diikuti invaginasi oleh membran sel dan diselubungi oleh membran plasma sel untuk membentuk endosom dimana liposom akan dibawa untuk berinteraksi dengan enzim-enzim lisosom yang dapat mendegradasi membran liposom. Setelah membran liposom terdegradasi, fosfolipid akan dihidrolisis menjadi asam lemak yang akan dimetabolisme kembali dan diinkorporasi ke dalam fosfolipid dari sel itu sendiri. Pada hepar mamalia, kolesterol akan dimetabolisme menjadi garam empedu.

Pada saat proses *breakdown* liposom di dalam lisosom, isi pada kompartemen cair liposom akan terbebaskan melalui eksositosis dari lisosom jika isi liposom tersebut bermuatan tinggi pada pH yang rendah atau keluar (*leakage*) secara perlahan. Selain fagositosis, liposom dapat pula di ambil melalui endositosis yang bermediasikan reseptor. Jika liposom diselubungi oleh *low density lipoprotein* (LDL) atau transferin, liposom akan menempel pada sel melalui reseptor untuk LDL dan transferin lalu diinternalisasi.

2.4. Aplikasi Pemakaian Liposom

Sebagai pembawa obat yang mirip dengan membran biologis, liposom merupakan zat yang biokompatibel yang sangat baik digunakan dalam bidang medis. Penggunaan liposom di bidang medis dapat didasarkan melalui sifat target alamiah liposom itu sendiri maupun target spesifik oleh liposom yang sudah dimodifikasi.

2.4.1 Target Alamiah Liposom

Aplikasi *in vivo* saat ini dapat diterapkan dalam diagnosis, kemoterapi, kanker, terapi imun, dan terapi gen. Dalam *in vivo*, walaupun terdapat variasi dalam komposisi membran, liposom konvensional hampir selalu berinteraksi secara eksklusif dengan organ-organ dari sistem retikuloendotelial (RES) seperti hepar, limpa, paru-paru, kelenjar limfe, dan sumsum tulang. Liposom dengan cepat diambil oleh sel fagosit dan didegradasi di dalam lisosom, kemudian materi-materi yang tersimpan di dalam liposom dikeluarkan ke dalam lisosom yang nantinya akan dilepaskan ke sitoplasma sel atau dieksositosis ke lingkungan eksternal sel. Perubahan distribusi obat secara *in vivo* ini menyebabkan efek toksik obat yang bersifat sistemik menjadi berkurang secara signifikan setelah pemberian secara parenteral, sementara itu konsentrasi obat yang berinteraksi dengan organ yang sakit dapat ditingkatkan beberapa kali lipat lebih tinggi daripada penggunaan obat bebas tanpa liposom.⁴

Dominansi pengambilan liposom oleh makrofag (RES) dapat digunakan dalam penghantaran dalam terapi penyakit intraseluler makrofag,⁸ seperti leishmania, infeksi jamur, dan juga penyakit-penyakit yang berhubungan dengan hepar dan jaringan paru-paru. Liposom mungkin efektif terhadap tumor, baik dari akumulasi dalam jumlah besar di organ yang terkena tumor maupun dengan menggunakan stimulator makrofag yang disimpan dalam liposom untuk meningkatkan aktivasi makrofag dan aktivitas antitumor agar dapat membunuh tumor.^{8,12} Imunomodulator yang disimpan dalam liposom dapat juga digunakan untuk stimulasi respon imun terhadap antigen yang dipresentasikan oleh makrofag secara *in vivo* di dalam maupun di permukaan liposom.^{4,12}

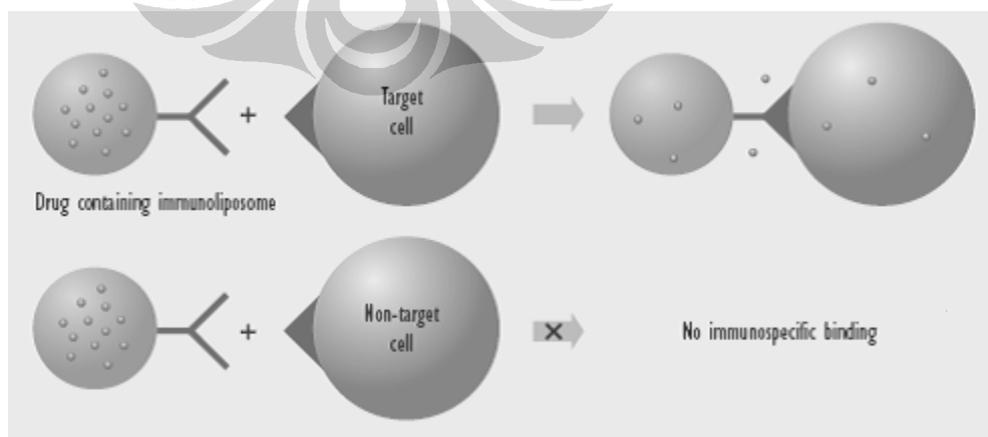
2.4.2 Target Spesifik Liposom

Ketika liposom diberikan melalui intravena, liposom akan menjadi target utama sel-sel retikuloendotelial hepar. Hal ini membuat liposom menjadi kurang dapat mencapai sel target.² Liposom yang tetap bertahan di dalam sirkulasi darah tidak akan dapat keluar, kecuali dalam jumlah yang sedikit melalui lesi di pembuluh darah atau pengambilan oleh monosit yang beredar.⁴

Pemakaian determinan molekular yang diinkorporasikan di sisi luar liposom untuk meningkatkan jangkauan dan spesifitas terhadap target yang dituju telah terbukti keberhasilannya.⁴ Berbagai macam protein dapat disisipkan ke dalam lapisan luar liposom untuk mengubah sifat liposom secara *in vivo* termasuk kemampuan pengiriman obat yang selektif terhadap sel. Perlakuan ini dapat membuat liposom yang diberikan secara intravena menjadi terhindar dari sistem retikuloendotelial. Protein ligan atau molekul-molekul antibodi yang berada di permukaan sel dapat diinkorporasi ke dalam permukaan liposom sehingga dapat membuat liposom menjadi spesifik terhadap reseptor di permukaan sel populasi tertentu.²

Kebanyakan penelitian mengenai liposom dengan target spesifik berhubungan dengan pemakaian antibodi atau fragmen antibodi yang terikat pada permukaan liposom. Liposom seperti ini disebut juga imunoliposom. Imunoliposom dapat memiliki target spesifik karena antibodi pada permukaan liposom hanya akan bereaksi pada sel yang memiliki antigen yang spesifik dengan antibodi pada permukaan liposom. Gambar 3 menunjukkan prinsip target spesifik oleh imunoliposom.^{8,12}

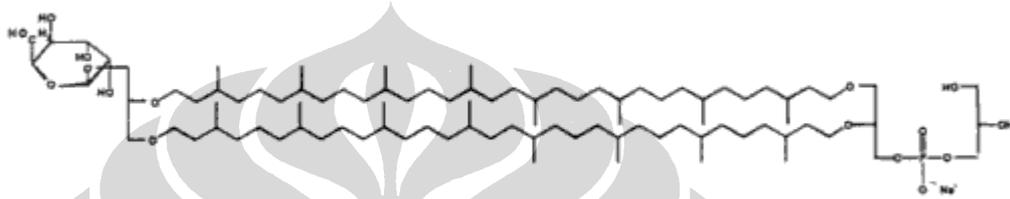
Selain antibodi, molekul lain juga dapat ditambahkan pada permukaan liposom, contohnya, penambahan plasminogen pada permukaan liposom dapat meningkatkan hantaran obat-obat fibrinolitik karena plasminogen memiliki afinitas yang kuat terhadap gumpalan fibrin.^{8,12}



Gambar 4. Prinsip dasar target spesifik imunoliposom⁸

2.5. Tetraeter Lipid

Tetraeter Lipid (TEL) merupakan salah satu produk hasil ekstraksi dari Archaea yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum* atau *Sulfolobus acidocaldarius*. Tetraeter lipid dari *Thermoplasma acidophilum* telah teruji tidak toksik dan tidak bersifat mutagenik atau antimutagenik pada uji toksisitas akut, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*, sedangkan TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* belum teruji toksisitasnya.^{5,13}



Gambar 5. Tetraeter lipid *Thermoplasma acidophilum*¹³

Lipid hasil ekstraksi membran dari Archaea ini, misalnya *Thermoplasma acidophilum* atau *Sulfolobus acidocaldarius*, berbeda secara nyata bila dibandingkan dengan fosfolipid pada membran sel lain yang membentuk dwilapis lipid (*lipid bilayer*). Fosfolipid tersebut berupa eter-gliserol (bukan ester gliserol); tanpa ikatan rangkap; dan memiliki gugus metil samping yang sebagian membentuk pentasiklik, tanpa atau dengan residu fosfat yang terikat melalui ikatan ester. Ikatan eter-gliserol sangat resisten terhadap hidrolisis pada PH rendah, sehingga memberi keuntungan dibandingkan ikatan ester. Selain itu, ketiadaan ikatan rangkap dalam struktur TEL akan meningkatkan resistensi terhadap oksidasi, sedangkan adanya gugus metil samping akan menambah efek fluiditas. Karena itu, liposom yang dibentuk dari TEL dari Archaea tersebut bersifat stabil dengan ikatan yang cukup erat.¹³

TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 digunakan untuk menstabilkan struktur lesitin. Secara konvensional, asam fosfatidat 2,5% ditambahkan pada liposom yang terbuat dari lesitin untuk meningkatkan kestabilan liposom tersebut melalui muatan negatifnya. TEL, dengan cara yang sama seperti asam fosfatidat dapat menambah muatan negatif pada liposom yang terbuat dari lesitin; selain itu secara kovalen dapat menghubungkan kedua permukaan polar pada membran dwilapis

liposom. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa TEL merupakan penstabil struktural dan elektrostatis membran dwilapis lesitin.¹³

Hingga saat ini belum ada bukti mengenai mekanisme interaksi TEL dengan membran sel hidup.¹³ Hasil penelitian sementara secara *in vitro* menunjukkan interaksi TEL dengan membran sel adalah fusi membran, transfer intermembran, dan endositosis. Namun hingga kini degradasi TEL di dalam sel belum dapat dijelaskan dengan baik karena produk standar hasil degradasi TEL belum tersedia.⁷

2.6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah salah satu model kromatografi dengan bentuk padat-cair yang menggunakan fasa diam hidrofilik-polar berupa antara lain, gel silika, selulosa yang dilekatkan pada matriks yang cocok dan dilapiskan secara tipis pada permukaan piring plastik atau gelas (lempeng). Fase gerak (eluen) dapat berupa pelarut tunggal atau kombinasi yang nantinya dapat bergerak secara horizontal atau vertikal berdasarkan sistem kapilaritas.⁷

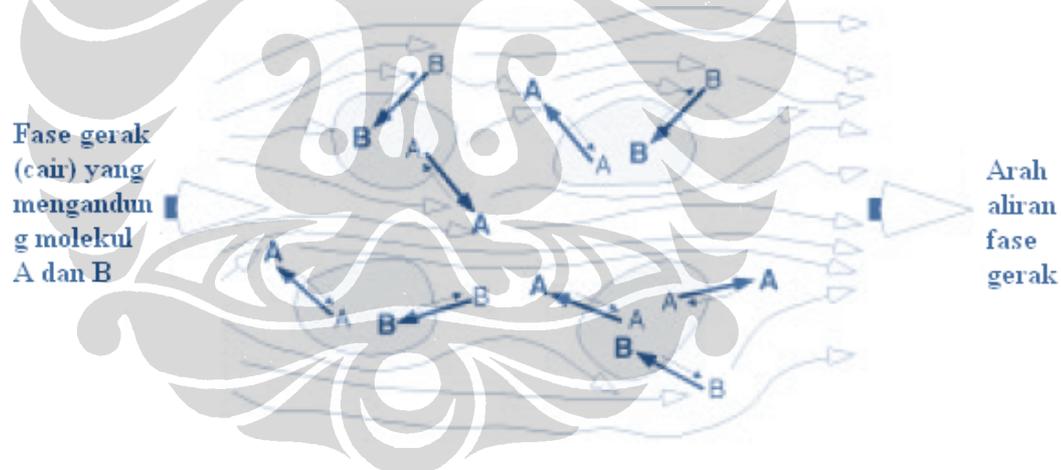
KLT merupakan teknik skala mikro yang dapat dipakai untuk menentukan jumlah komponen pada suatu campuran (mikstura), mengidentifikasi substans tertentu, memonitor proses suatu reaksi, menentukan kondisi yang sesuai untuk kromatografi kolom, dan menganalisis fraksi yang didapat dari kromatografi kolom.

2.6.1 Prinsip Kerja Kromatografi Lapis Tipis

Semua bentuk kromatografi termasuk KLT melibatkan kesetimbangan dinamis suatu molekul di antara dua bentuk, yaitu bentuk bebas dimana molekul tersebut secara sempurna larut di dalam fase gerak dan bentuk teradsorpsi dimana molekul tersebut melekat (teradsorpsi) secara kuat pada fase diam. Kelarutan molekul pada fase gerak dan perlekatan molekul pada fase diam tidaklah permanen, terdapat pergerakan konstan molekul antara terlarut pada fase gerak dan kembali melekat pada fase diam.^{14,15} Kesetimbangan antara kedua bentuk diatas dipengaruhi oleh tiga faktor, yaitu kepolaran dan ukuran molekul, kepolaran fase diam, dan kepolaran fase gerak. Kepolaran suatu molekul dipengaruhi oleh strukturnya sehingga dengan memilih fase gerak dan diam dan

berbeda, kesetimbangan molekul diantara bentuk bebas dan teradsorpsi dapat dirubah.¹⁴

Molekul yang berbeda akan memiliki kesetimbangan bentuk bebas dan bentuk teradsorpsinya yang berbeda pula. Molekul yang diadsorpsi secara lemah oleh fase diam memiliki kesetimbangan kearah bentuk bebasnya sehingga konsentrasi pada fase gerak lebih banyak dibanding pada fase diam dan sebaliknya. Secara umum, molekul dapat bergerak sepanjang lempeng pada saat molekul tersebut larut pada fase gerak. Ketika molekul sedang teradsorpsi pada fase diam, molekul berhenti bergerak untuk sementara waktu sehingga fase gerak bergerak tanpa bersama molekul.¹⁵ Molekul yang memiliki kesetimbangan kearah bentuk bebas akan memiliki waktu terlarut yang lebih lama dalam fase gerak sehingga bergerak bersama fase gerak lebih cepat dibanding molekul yang memiliki kesetimbangan kearah bentuk teradsorpsi.¹⁴ Gambar skematis mengenai kesetimbangan dinamis antara bentuk bebas dengan bentuk teradsorpsi dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 6. Kesetimbangan dinamis molekul A dan B pada fase gerak dan fase diam.¹⁴ Molekul A teradsorpsi secara lemah pada fase diam sehingga kesetimbangannya bergerak kearah bentuk bebas. Molekul B teradsorpsi secara kuat pada fase diam sehingga kesetimbangannya ke arah bentuk teradsorpsi.

Pada KLT, fase diam biasanya berupa alumina ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)_n dan gel silica ($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)_n. Pada permukaan silika dan aluminium terdapat gugus -OH yang terikat.¹⁵ Adanya gugus -OH membuat permukaan alumina dan gel silika menjadi sangat polar karena gugus -OH dapat membentuk ikatan hidrogen, ikatan van der waals, dan interaksi dipol-dipol dengan molekul yang sesuai.¹⁵ Selain itu

karakteristik elektropositif aluminium atau silikon dan keelektronegatifan oksigen pada fase diam juga berperan dalam kepolarannya. Oleh karena itu, semakin polar molekul yang ingin dipisahkan, semakin kuat molekul tersebut terikat pada fase diam sehingga kesetimbangan molekul akan berpindah ke arah bentuk teradsorbsinya, hal dapat dijelaskan melalui istilah “*like-dissolves-like*”. Molekul nonpolar memiliki afinitas yang lebih lemah pada fase diam sehingga berada pada bentuk terlarut lebih lama.¹⁴

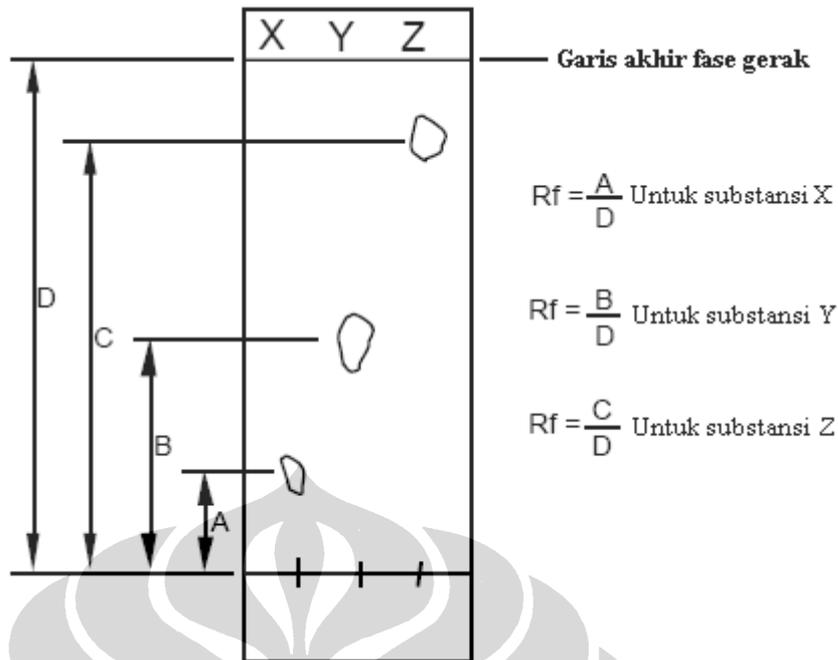
Kesetimbangan menentukan pemisahan suatu molekul, tapi adanya tarik menarik molekul antara fase diam dan fase gerak menentukan kesetimbangan molekul tersebut. Oleh karena itu, dengan memilih dan memodifikasi fase gerak dan fase diam, pemisahan suatu molekul dapat diatur sesuai keperluan. Secara umum semakin polar suatu molekul akan semakin kuat terikat pada fase diamnya dan semakin pelan molekul tersebut bergerak bersama fase gerak.¹⁴

2.6.2 Retention Factor (*R_f*)

R_f adalah nilai faktor retensi dalam bentuk desimal. Nilai *R_f* dapat dihitung dengan rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh bercak}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Nilai *R_f* dapat dihitung untuk setiap bercak yang muncul pada lempeng KLT. Secara umum *R_f* menggambarkan jarak yang ditempuh oleh suatu molekul. Jika dua buah molekul menempuh jarak yang sama atau memiliki *R_f* yang sama maka mungkin dapat disimpulkan bahwa kedua molekul tersebut merupakan molekul yang sama.¹⁴ Agar perbandingan *R_f* menjadi sah, lempeng KLT harus di *running* pada kondisi yang sama. Kondisi ini termasuk pada fase diam, fase gerak, suhu, dan kejenuhan *chamber*. Seperti molekul organik lain yang dapat memiliki titik didih dan warna yang sama, beberapa molekul dapat memiliki nilai *R_f* yang sama sehingga *R_f* yang identik tidak dapat langsung memastikan molekul tersebut identik.¹⁴ Gambar 5 memperlihatkan diagram lempeng KLT dan cara bagaimana cara pengukuran nilai *R_f*.



Gambar 7. Contoh perhitungan nilai R_f ⁴³

2.6.3 Aplikasi Kromatografi Lapis Tipis pada Lipid

Seperti semua metode kromatografi, KLT pada lipid juga menggunakan 2 fase yang berbeda. Solut pada fasa gerak akan memiliki afinitas yang berbeda terhadap fasa diam (gel). Seiring dengan berjalannya fasa gerak melalui fasa solid, lipid yang berbeda akan menyebar dan menetap di daerah yang berbeda pada gel.

Pada KLT untuk memisahkan fosfolipid, fasa diam yang paling umum digunakan adalah gel silika. Fase gerak dapat ditambahkan kloroform atau air untuk menambah atau mengurangi sifat hidrofiliknya. Pada fosfolipid biasanya ditambahkan kloroform.⁴

Lipid dapat divisualisasikan menggunakan pewarnaan spesifik yang disebarkan pada permukaan piring atau melalui metode non-spesifik dengan pemberian yodium. Jika lipid dapat menyerap UV, maka visualisasinya dilakukan pada fasa diam yang mengandung materi fluoresen tanpa pewarnaan. Dengan demikian ketika diiluminasi dengan sinar UV bercak akan terlihat terang pada latar yang gelap. Identifikasi lipid yang berbeda didasarkan pada kecepatan gerak masing-masing lipid (diekspresikan dengan nilai R_f), dan dibandingkan dengan kontrol yang dijalankan pada piringan yang sama.⁴

KLT juga dapat memberi informasi mengenai kemurnian dan konsentrasi lipid. Lipid murni akan meninggalkan titik tunggal pada fasa diam. 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

2.7. Spesifikasi Mencit C3H

Mencit telah dipakai secara luas pada berbagai bidang penelitian seperti bidang medis, kimia, farmakologi, toksikologi, biologi, dan genetika. Walaupun sifatnya kurang kooperatif dan ramah, mencit memiliki beberapa keuntungan, yaitu laju reproduksi yang tinggi, ukurannya yang kecil, dan stamina yang kuat. Selain itu mencit menunjukkan respon yang lebih ramah dibandingkan dengan tikus pada saat ditangani. Hal inilah yang menjadikan mencit sebagai hewan coba paling banyak digunakan pada penelitian *in vivo*.¹⁶

Mencit C3H yang dibudidayakan sejak tahun 1960 oleh bagian Patologi Anatomi FKUI telah menghasilkan *breeding* ratusan kali, umumnya digunakan pada penelitian tumor atau kanker. Mencit ini merupakan hasil kawin silang antara Bagg albino dengan galur DBA yang dilakukan oleh L.C. Strong.^{7,16} Mencit C3H telah menjadi standard penelitian di bidang biologi.¹⁶ Selain itu, mencit C3H dapat digunakan pada penelitian umum, penelitian kanker, penelitian sensorineural dll.¹⁶

Respon imunologik pada mencit secara umum sangat dipengaruhi oleh sifat fisik dan kimia antigen termasuk bentuk sediaan (larutan atau suspensi) yang akan dipaparkan, cara pemberian, umur, intensitas, dan lama imunisasi serta faktor genetik.⁷ Dalam keadaan normal, dengan pemberian makanan standar dan vitamin serta minum secukupnya, mencit berumur 12-16 minggu mempunyai berat badan sekitar 18-24 gram. Pada pemeriksaan darah rutin, kadar hemoglobin rata-rata adalah sebagai berikut: timus 27 mg, limpa 150 mg, sedangkan organ lain semisal hepar seberat 900 mg dan ginjal sekitar 120 mg.

Cara mematikan mencit menurut persyaratan etika biomedik adalah dengan meletakkan mencit ke dalam wadah khusus, umumnya dialasi dengan kapas atau tisu, agar dapat atau mudah dibasahi dengan kloroform atau eter, di luar kandang pemeliharaan. Apabila mencit harus dimatikan di dalam ruangan

(kandang pemeliharaan), penggunaan kloroform atau eter tidak boleh dilakukan dan harus menggunakan karbon dioksida. Jumlah hewan per wadah dianjurkan secukupnya agar tidak saling melukai sebelum mati.

2.8 Injeksi Intraperitoneal pada Mencit

Injeksi intraperitoneal merupakan cara pemberian yang paling sering dipakai karena secara teknis mudah dilakukan. Injeksi melalui jalur intraperitoneal memungkinkan periode absorpsi zat dari tempat injeksi yang cukup lama. Permukaan yang luas pada rongga peritoneal dan banyaknya suplai darah memfasilitasi laju absorpsinya. Laju absorpsi pada injeksi secara intraperitoneal biasanya setengah atau seperempat kali lebih lambat dari injeksi intravena.¹⁶ Namun laju absorpsi tersebut juga dipengaruhi oleh sifat kimia dan fisik, kelarutan di dalam cairan jaringan dan lemak, derajat ionisasi, ukuran molekular, dan konsentrasi substansi yang diberikan.¹⁶

Keterbatasan pada injeksi intraperitoneal yaitu sensitivitas jaringan terhadap substansi iritatif. Substansi yang diberikan harus memiliki pH fisiologis dan bersifat isotonik. Namun, volume maksimal yang dapat diberikan melalui rute intraperitoneal cukup besar, yaitu 2 – 3 mL.¹⁶

Pada saat injeksi, rasa sakit dan stres harus ditekan sekecil mungkin. Cara memegang dan menahan yang benar akan mempengaruhi keberhasilan injeksi liposom.¹⁶ Pada injeksi secara intraperitoneal, mencit yang sadar ditahan dalam posisi supinasi dengan bagian posterior diangkat atau bagian kepala diletakkan lebih rendah dari posisi tubuh.¹⁶ Jarum suntik harus selalu dijaga hampir paralel terhadap kolumna vertebra mencit untuk menghindari penetrasi viscera secara tidak sengaja. Jarum suntik dengan ukuran 23G atau lebih besar¹⁷ dimasukkan dengan sudut 10 derajat antara jarum dan permukaan abdomen pada kuadran bawah abdomen. Lakukan aspirasi untuk mengecek apakah jarum menembus organ.¹⁷ Jika terdapat materi yang teraspirasi, jarum harus segera dicabut dan dibuang. Untuk menghindari kebocoran dari situs injeksi, jarum harus menembus jaringan subkutan sekitar 2-3 mm kearah kranial sebelum menembus dinding abdomen.¹⁷

2.8. Kerangka Konsep

