

## BAB IV

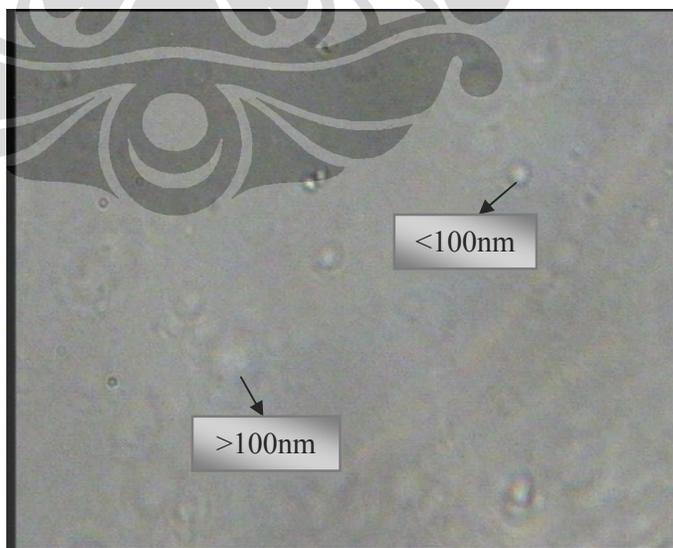
### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Hasil

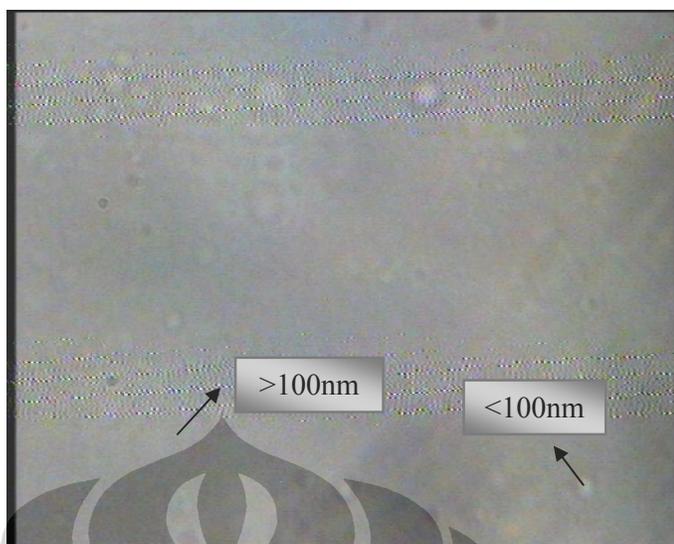
Liposom EPC-TEL 2,5 dibuat dengan mencampurkan EPC dan TEL, dimana kadar TEL adalah 2,5 % dari mol EPC. Perhitungannya dapat dilihat pada Lampiran 1. Campuran EPC dan TEL tersebut kemudian didispersikan dengan Buchi-rotavapor. Hasil dispersi tersebut masih berupa vesikel multilamellar besar. Sedangkan yang dibutuhkan adalah vesikel unilamellar kecil sehingga dilakukan sonikasi pada liposom EPC-TEL 2,5 tersebut. Liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi inilah yang akan diberi perlakuan berupa penambahan larutan  $\text{MgCl}_2$  150 mOsmol pH 7.

Liposom EPC-TEL 2,5 kontrol dan yang diberi perlakuan diamati pada hari ke-0, 7, 30, 60, dan 90 dengan mengambil foto sebanyak sepuluh kali dan video selama 15 detik. Kemudian dari foto tersebut dihitung jumlah liposom serta prakiraan ukurannya berdasarkan skala ukur yang dapat dilihat pada Lampiran 3.

Contoh foto liposom EPC-TEL 2,5 yang dipaparkan larutan  $\text{MgCl}_2$  150 mOsmol pH 7 pada pengamatan hari ke-7 dan pengamatan hari ke-90 dapat dilihat pada Gambar 13, sedangkan yang lainnya dapat dilihat pada Lampiran 4.



(A)



(B)

Gambar 13. (A) Liposom EPC-TEL 2,5 dengan Pemaparan Larutan  $MgCl_2$  150 mOsm pH 7 pada Pengamatan Hari ke-7 (B) Liposom EPC TEL 2,5 dengan Pemaparan Larutan  $MgCl_2$  150 mOsm pH 7 pada Pengamatan Hari ke-90

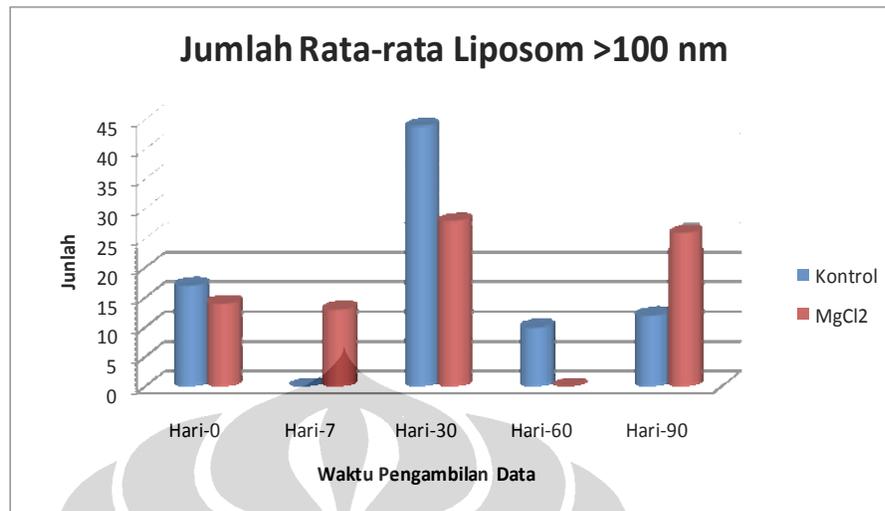
Hasil perhitungan jumlah liposom berdasarkan diameternya dilakukan dengan ulangan sebanyak tiga kali. Berdasarkan skala ukur, diameter liposom dibagi menjadi dua kategori yaitu liposom dengan diameter  $\leq 100$  nm dan  $> 100$  nm. Hasil perhitungan jumlah liposom pada hari ke-0, 7, 30, 60 dan 90 dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Perhitungan Jumlah Liposom Berdasarkan Diameter

		Perlakuan			
		Kontrol		$MgCl_2$ pH 7	
		$\leq 100$ nm	$> 100$ nm	$\leq 100$ nm	$> 100$ nm
<b>Hari 0</b>	<b>Data I</b>	299	9	195	20
	<b>Data II</b>	215	4	168	3
	<b>Data III</b>	227	39	273	20
	<b>Mean</b>	247	17	212	14
<b>Hari 7</b>	<b>Data I</b>	224	0	198	13

	<b>Data II</b>	218	1	186	10
	<b>Data III</b>	209	0	169	15
	<b>Mean</b>	217	0	184	13
<b>Hari 30</b>	<b>Data I</b>	287	115	165	34
	<b>Data II</b>	180	3	157	2
	<b>Data III</b>	286	12	240	47
	<b>Mean</b>	251	44	187	28
<b>Hari 60</b>	<b>Data I</b>	349	9	45	0
	<b>Data II</b>	21	0	42	0
	<b>Data III</b>	231	21	331	0
	<b>Mean</b>	200	10	139	0
<b>Hari 90</b>	<b>Data I</b>	269	17	130	43
	<b>Data II</b>	60	5	86	0
	<b>Data III</b>	161	14	135	34
	<b>Mean</b>	163	12	117	26

Sesuai dengan kriteria stabil, yaitu diameter liposom tidak bertambah dan jumlah liposom yang >100 nm tidak bertambah, hanya data liposom yang >100 nm saja yang akan dianalisis. Berdasarkan grafik pada Gambar 14 yang hanya menampilkan jumlah liposom >100 nm, terlihat fluktuasi baik pada kelompok kontrol maupun MgCl<sub>2</sub>. Liposom pada kelompok kontrol pada hari ke-7 turun drastis dan kemudian mengalami peningkatan yang signifikan pada hari ke-30 dan turun kembali pada hari ke-90. Sedangkan liposom kelompok perlakuan cenderung mengalami peningkatan jumlah sampai hari ke-30 dan turun drastis pada hari ke-60 kemudian meningkat lagi pada hari ke-90.



Gambar 14. Grafik Jumlah Rata-rata Liposom Berdiameter >100 nm

Pada penelitian ini data yang diperoleh adalah data kategorial atau non-parametrik, lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan, sehingga untuk menganalisis data tersebut digunakan metode Kruskal-Wallis *one-way* ANOVA.<sup>36</sup> Dari hasil analisis statistik tersebut, diperoleh nilai probabilitas (*p*) adalah 0,180. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara setiap kelompok perlakuan liposom. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa liposom EPC-TEL 2,5 berdiameter >100 nm tetap stabil dalam larutan MgCl<sub>2</sub> 150 mOsm pH 7 selama 90 hari masa penyimpanan pada suhu 4 °C.

#### 4.2 Pembahasan

Penelitian ini merupakan kelanjutan penelitian terhadap liposom EPC-TEL 2,5 yang terbukti dapat mengikat obat metilprednisolon palmitat lebih baik dan terbukti menunjukkan efek terapi, efek imunologik, serta terdistribusi dengan baik di dalam organ, yang berbeda bermakna dibandingkan kontrol yaitu metilprednisolon tanpa liposom. Liposom formulasi baru ini belum terbukti stabil secara kimia, fisika, dan biologi, baik *in vitro* maupun *in vivo*. Oleh karena itu, dilakukan penelitian uji stabilitas kimiawi terhadap liposom formulasi baru tersebut.

Liposom EPC-TEL 2,5 yang dipaparkan larutan  $MgCl_2$  150 mOsm pH 7 dilihat kestabilannya berdasarkan jumlah dan prakiraan ukurannya melalui foto yang diambil pada hari 0, 7, 30, 60, 90. Liposom menjadi tidak stabil karena mengalami agregasi, fusi, atau kehilangan komponen penyusunnya. Pada penelitian ini, liposom yang berukuran  $>100$  nm yang digunakan sebagai parameter kestabilan, karena dengan anggapan bahwa semakin banyak liposom yang berukuran  $>100$  nm, berarti semakin banyak liposom yang mengalami fusi atau dengan kata lain tidak stabil.

Liposom yang berukuran  $\leq 100$  nm sebenarnya juga dapat dinilai berdasarkan jumlahnya yang tidak berkurang. Namun, dengan tidak berkurangnya jumlah, liposom tersebut belum dapat dikatakan stabil, karena dengan kehilangan komponen penyusunnya liposom dapat menjadi tidak stabil. Keterbatasan alat untuk menilai komponen penyusun liposom tersebut menyebabkan liposom yang berukuran  $\leq 100$  nm tidak dapat digunakan sebagai parameter kestabilan.

Kromatografi merupakan metode yang dapat digunakan untuk menilai perubahan fisik yang terjadi karena hilangnya komponen penyusun membran. Melalui kromatografi, dapat diketahui perubahan massa partikel liposom pada setiap hari pengamatan. Sehingga, berkurangnya massa liposom akibat hilangnya komponen penyusun membran, termasuk diantaranya adalah TEL, dapat dinilai. Dengan kata lain, liposom yang berukuran  $\leq 100$  nm dapat dinilai kestabilannya dengan metode ini.

Kestabilan liposom dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu, komponen penyusun liposom, muatan membran, ukuran liposom, pH larutan, suhu penyimpanan, dan komposisi larutan penyangga.

Pada penelitian ini liposom yang digunakan adalah liposom formulasi baru EPC-TEL 2,5. Sebenarnya pada awal rencana penelitian akan digunakan TEL yang berasal dari *Sulfolobus acidocaldarius*, namun karena ketidakterseediaannya maka TEL yang dikombinasikan dengan EPC adalah TEL yang berasal dari *Thermoplasma Acidophilum*.

Penambahan TEL ke dalam komposisi lipid dalam penelitian ini dimaksudkan untuk membuktikan bahwa TEL juga dapat menstabilkan liposom

konvensional<sup>18</sup>, selain kolesterol<sup>37-39</sup> dan asam fosfatidat.<sup>40</sup> TEL dipilih sebagai penstabil membran karena TEL mempunyai struktur berupa 2 gugus kepala polar (*polar head group*) dengan tebal membrane sekitar 4 nm (dari ujung kepala satu ke ujung kepala lain), sehingga diharapkan akan dapat berinkorporasi dengan membran liposom EPC (Gambar 15)<sup>19</sup>. Dengan demikian, stabilitas membran diperkirakan akan lebih baik.<sup>18,31</sup>



Gambar 15. Gambaran Skematis Inkorporasi TEL dalam Membran Dwilapis Lipid dari EPC (EPC =  $\circ\sim\sim\circ$ ; TEL =  $\bullet\sim\sim\bullet$ )<sup>19</sup>

Pada beberapa penelitian lain tentang kombinasi TEL *Thermoplasma acidophilum* dan EPC, dibuktikan bahwa liposom hasil kombinasi tersebut, baik pada rasio 25:75 ataupun 50:50, akan menambah muatan negatif pada permukaan membran liposom, sehingga liposom tetap stabil. Uji stabilitas berdasarkan ukuran partikel dengan nilai batas stabilitas sebesar 50% ini menunjukkan, bahwa pada suhu penyimpanan 4-8 °C liposom tetap stabil hingga 622 hari walaupun ukuran partikel liposom membesar hingga 33% dari awal penyimpanan. Uji stabilitas liposom TEL ini diukur berdasarkan ukuran partikel dengan menggunakan *particle sizer*.<sup>32</sup>

Pada penelitian berbeda oleh Freisleben HJ<sup>32</sup>, menunjukkan liposom yang hanya terdiri dari atas TEL *Thermoplasma acidophilum* cukup stabil pada pH rendah dibandingkan pada pH netral ataupun alkalis yaitu selama 109 minggu pada suhu 4-8 °C dan 10 minggu pada suhu 100 °C.

Penelitian oleh Patel dan kawan-kawan<sup>41</sup> pada archaeosome yaitu liposom yang terbuat dari membrane Archae lain yaitu *Methanosarcina mazei*, *Methanobacterium espanolae* dan *Thermoplasma acidophilum* menunjukkan bahwa vesikel multilamellar (MLV) dari *T.acidophilum*, *in vitro*, paling stabil di antara ketiga jenis Archae tersebut.

Selain itu, TEL juga dipilih karena TEL dapat menambah muatan negatif pada membran liposom. Liposom yang bermuatan netral lebih mudah mengalami agregasi karena adanya interaksi ikatan Van der Waals, hal ini tidak terjadi pada liposom bermuatan. TEL juga mempunyai ikatan eter yang sangat resisten terhadap hidrolisis. Berdasarkan karakter tersebut, diharapkan dengan menambahkan TEL pada liposom konvensional dapat meningkatkan kestabilan liposom.<sup>26</sup>

Ukuran liposom juga merupakan salah satu faktor yang berpengaruh pada kestabilan liposom. Liposom dengan ukuran yang lebih besar mempunyai area yang lebih luas untuk memungkinkan interaksi ikatan Van der Waals, sehingga agregasi lebih mudah terjadi. Sedangkan liposom SUV pada penelitian ini dibuat metode sonikasi. Dengan sonikasi, kecenderungan liposom mengalami oksidasi semakin besar, sehingga liposom dapat menjadi tidak stabil.<sup>26</sup>

Selain itu kestabilan liposom juga dipengaruhi oleh suhu dan pH. Liposom disimpan pada suhu 4 °C karena banyak preparat obat yang disimpan pada suhu ini dan perlu diketahui liposom tidak baik disimpan pada suhu terlalu rendah (-80 °C) karena akan menyebabkan pembekuan serta efluks air dari liposom, sehingga liposom menjadi tidak stabil.<sup>40</sup> Pada penelitian Freisleben HJ<sup>32</sup>, juga dibuktikan bahwa liposom yang disimpan pada suhu 4-8 °C lebih tahan lama dibandingkan yang disimpan pada suhu 100 °C. Hal ini mungkin disebabkan oleh permeabilitas liposom yang meningkat pada suhu tinggi. Karakter ini sebenarnya digunakan untuk pengobatan, karena pada saat inflamasi terjadi peningkatan suhu sehingga liposom yang dalam hal ini membawa obat dapat melepaskan isinya. Sedangkan pH netral dipilih untuk memperlambat proses hidrolisis yang terjadi selama penyimpanan.<sup>26</sup>

Liposom pada penelitian ini dipaparkan dengan larutan garam MgCl<sub>2</sub> untuk mengetahui pengaruh larutan tersebut terhadap kestabilan liposom. Larutan

garam yang sifatnya netral ini dipilih untuk menghindari reaksi dengan liposom yang bermuatan. Selain itu,  $MgCl_2$  juga digunakan untuk mengobati berbagai penyakit dan berfungsi sebagai imunostimulan.<sup>35</sup> Sehingga besar kemungkinannya liposom sebagai pembawa obat diberikan bersama dengan larutan  $MgCl_2$ , maka perlu dilakukan uji secara *in vitro* terlebih dahulu, kemudian *in vivo*.

Pada penelitian ini telah dibuktikan liposom EPC-TEL 2,5 yang terpapar larutan  $MgCl_2$  150 mOsm pH 7 selama 90 hari dengan suhu penyimpanan 4 °C tidak mengalami destabilisasi yang signifikan berdasarkan parameter kestabilan yang digunakan. Faktor-faktor yang telah disebutkan sebelumnya yang memungkinkan liposom menjadi tidak stabil, tidak mempunyai pengaruh yang bermakna, sehingga dapat dikatakan liposom formulasi baru ini stabil.

Namun pada penelitian ini terdapat kelemahan yang tidak bisa dihindarkan, yaitu distribusi liposom pada kaca preparat liposom yang tidak merata sehingga foto lapang pandang liposom yang diambil tidak mencerminkan jumlah liposom yang sebenarnya. Perhitungan jumlah liposom yang dilakukan secara manual menghasilkan data yang sangat subjektif karena tidak tersedianya *particle sizer* yang dapat mengukur liposom dengan tepat. Hal ini menjadi kekurangan pada penelitian ini, karena data yang diperoleh bukan data numerik dan tidak dapat dianalisis menggunakan uji parametrik. Sehingga hasil yang diperoleh kurang sensitif.