

## **BAB III**

### **METODOLOGI**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro* pada liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan pemaparan larutan  $MgCl_2$  150 mOsm pH 7. Objek disimpan pada suhu 4 °C selama 90 hari dan diamati pada hari ke-0, hari ke-7, hari ke-30, hari ke-60 dan hari ke-90.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di empat laboratorium, yaitu Laboratorium Farmasi, Fisika, Farmakologi, dan Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, yang berlangsung dari bulan Maret 2007 sampai dengan Maret 2008.

#### **3.3 Alat dan Bahan**

Peralatan yang digunakan antara lain:

- Rotavapor, pompa vakum, penangas air dan gelas labu dari Büchi
- Bath Titanium Sonicator tipe Branson 1510
- Mikroskop listrik “Olympus”
- Kamera Sony CCD-IRIS color video camera
- Program Win USB TV version 2.0
- Komputer
- Botol kaca berukuran 20 mL
- Spuit 2,5 mL.
- Neraca listrik Mettler AE-200 dan pHmeter
- Kaca preparat berskala “Olympus”
- Kaca penutup dan kertas saring
- Pipet dengan ujung biru
- Hamilton Syringe 25 mikroliter
- Lemari es

Bahan yang digunakan antara lain:

- Fosfatidilkolin dari kuning telur (egg-yolk Phosphatidylcholine=EPC) dari Lipoid®
- Tetraeter lipid (TEL) dari IFB Halle Jerman
- Chloroform
- Ethanol 90%
- Penanda bercak Quinakrin 0,05%
- Aquabidest
- Larutan  $MgCl_2$  150 mOsmol pH 7

### 3.4 Cara Kerja

Sediaan liposom yang digunakan pada penelitian ini dibuat berdasarkan langkah-langkah berikut:

1. Buchi Rotavapor dipanaskan, kemudian air dituang ke dalam penangas air dengan jumlah yang sesuai agar labu dapat terendam.
2. EPC dan TEL (kadar TEL 2,5% dari mol EPC) ditimbang sesuai dengan perhitungan yang terdapat pada lampiran menggunakan neraca listrik Mettler AE-200 yang dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Neraca Listrik Mettler AE-200

3. EPC dan TEL dicampur kemudian ditambahkan Cloroform dan Etanol dengan perbandingan 1:1 (masing-masing 5 mL).

4. Selanjutnya, campuran EPC-TEL, Cloroform, Etanol dimasukkan ke dalam labu yang berisi *beads*.
5. Campuran didispersi dengan menggunakan Buchi Rotavapor selama 2 jam. Air di dalam waterbath harus bersuhu 40°C dengan tekanan pada vakum dipertahankan 200 barr dan setelah kering tekanan pada vakum dipertahankan di bawah 50 barr. Gambar 10 menunjukkan Buchi Rotavapor.



Gambar 10. Buchi Rotavapor

6. Setelah campuran mengering, Aquades ditambahkan hingga volume mencapai 50 mL (sesuai dengan volume yang dibutuhkan), kemudian dirotasi kembali sampai homogen. Campuran yang telah mengering dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Liposom yang Telah Meringing

Setelah membuat sediaan liposom, langkah selanjutnya adalah melakukan sonikasi agar diperoleh vesikel unilamellar kecil. Sonikasi sediaan liposom sebanyak 15 mL dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia selama 60 menit dengan menggunakan *Bath Titanium Sonicator* tipe Branson 1510. Kemudian sampel hasil sonikasi tersebut ditambahkan penanda bercak Quinakrin sesuai dengan perhitungan pada lampiran. Gambar 12 menunjukkan liposom yang sedang disonikasi dengan menggunakan Bath Titanium Sonicator tipe Branson 1510.



Gambar 12. Liposom yang Sedang Disonikasi

Liposom yang telah disonikasi dan ditambahkan Quinakrin dibagi menjadi dua bagian, masing-masing 2 mL yang dimasukkan ke dalam botol kaca yang diberi label kontrol dan  $MgCl_2$ . Pada bagian kontrol tidak diberi perlakuan apapun lagi. Sedangkan pada botol yang berlabel  $MgCl_2$ , ditambahkan larutan  $MgCl_2$  150 mOsm pH 7 dengan perbandingan 1:1. Kemudian simpan kedua botol tersebut di dalam lemari es.

Pengambilan data untuk memperoleh jumlah dan prakiraan ukuran liposom dilakukan secara periodik, pada hari ke-0, hari ke-7, hari ke-30, hari ke-60, dan hari ke-90. Urutan langkah kerja yang dilakukan untuk memperoleh data tersebut, sebagai berikut:

1. Gelas objek kaca dan penutupnya dibersihkan dengan alkohol 90 % dan digunakan setelah mengering.
2. Mikroskop kamera disiapkan.

3. Dua puluh lima mikroliter liposom yang telah dicampur dengan *Quinakrin* diteteskan pada gelas objek.
4. Gelas objek ditutup dengan kaca penutup dan jangan sampai ada gelembung udara.
5. Kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 x (dapat disesuaikan).
6. Fokus ditentukan, kemudian fokus yang sesuai dicatat.
7. Sepuluh foto diambil, kemudian satu video dengan durasi 15 detik. Data yang diperoleh segera disimpan.
8. Langkah yang sama diulangi pada tiap sampel yang diuji.

Setelah data diperoleh dilakukan perhitungan jumlah liposom dan pengukuran liposom berdasarkan skala ukur yang dapat dilihat pada Lampiran 3, sehingga diperoleh 2 kategori ukuran, yaitu  $\leq 100$  nm dan  $> 100$  nm. Perhitungan dan pengukuran liposom ini dilakukan dengan ulangan sebanyak tiga kali, sehingga diperoleh tiga macam data.

### **3.5 Analisis Data**

Data yang diperoleh berupa data kategorial atau non-parametrik akan dianalisis dengan menggunakan metode Kruskal-Wallis *one-way Anova*, dengan batas kemaknaan  $p=0,05$ . Pengolahan data akan menggunakan program SPSS ver.11.5.