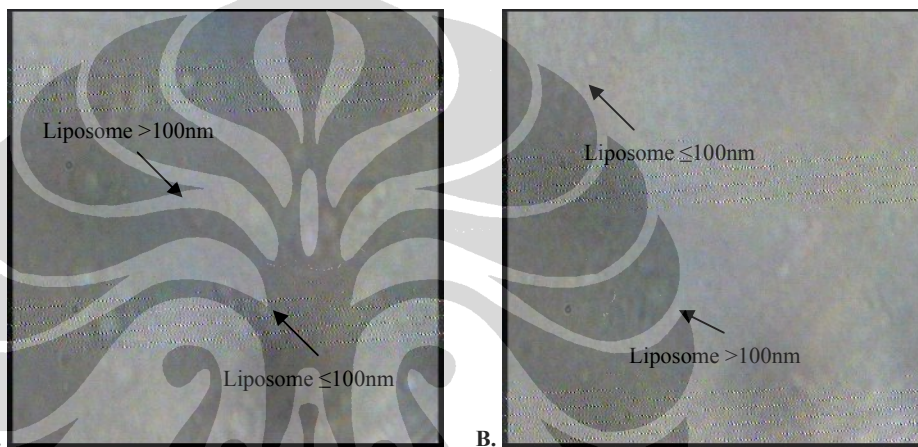


BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparat liposom yang dibuat dengan mencampurkan EPC sebanyak 390 mg dan TEL 18,605 mg menghasilkan liposom EPC-TEL 2,5 sebanyak 50 ml. Liposom yang didapatkan ini masih merupakan MLV, sehingga untuk mendapatkan liposom *small unilamellar vesicle* yang berukuran $<100\text{nm}$, dilakukan sonikasi menggunakan sonikator Branson tipe 1510. Jumlah dan diameter liposom akan dihitung terhadap foto yang salah satunya dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Liposom EPC-TEL 2,5 pada Hari ke-90 (A) Liposom EPC-TEL 2,5 dengan Penambahan NaCl 150 mOsmol pH 7. (B) liposom EPC-TEL 2,5 Kontrol.

Foto liposom di atas diambil pada hari ke-90 penelitian. Dari gambar A yang merupakan liposom dengan penambahan NaCl 150 mOsmol pH 7, terlihat vesikel-vesikel liposom dengan jumlah yang cenderung lebih banyak dibandingkan pada liposom kontrol yang terlihat pada gambar B. Dari perhitungan jumlah dan diameter liposom pada hari ke-90 ini, dari 10 foto liposom yang diambil, didapatkan rata-rata jumlah liposom kontrol dengan ukuran $>100\text{ nm}$ sebanyak 12 buah dan rata-rata liposom NaCl 150 mOsmol pH 7 ukuran $>100\text{ nm}$ sebanyak 52,67. Sedangkan untuk rata-rata liposom berukuran $<100\text{ nm}$ sebanyak 163,33 untuk liposom kontrol dan 169,33 untuk liposom dengan NaCl 150 mOsmol pH 7. Dari hasil ini, dapat terlihat bahwa terdapat perbedaan jumlah liposom antara kedua perlakuan, di mana jumlah liposom yang

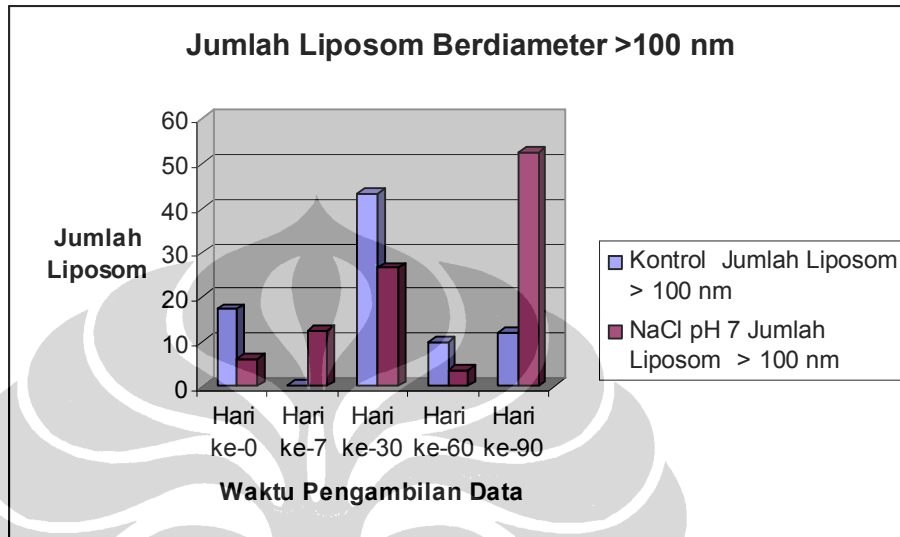
berukuran >100 nm cenderung lebih banyak pada liposom dengan NaCl 150 mOsmol pH 7 dibandingkan dengan kontrol, sedangkan untuk liposom dengan ukuran <100 nm, jumlahnya lebih banyak pada liposom kontrol dibandingkan dengan liposom NaCl 150 mOsmol pH 7.

Foto-foto liposom yang diambil pada hari ke-0, 7, 30 dan 60 dapat dilihat pada Lampiran 4. Berdasarkan penghitungan jumlah dan diameter liposom terhadap foto-foto tersebut didapatkan data jumlah liposom dengan dua kategori yaitu yang berukuran >100 nm maupun yang berukuran <100nm. Data yang diperoleh hanya dapat dibagi menjadi dua kategori, dikarenakan tidak tersedianya alat pengukur partikel liposom (*particle sizer*). Dari penghitungan jumlah liposom yang dilakukan pada hari ke 0, 7, 30, 60 dan 90, didapatkan data yang dapat dilihat pada Tabel 1.

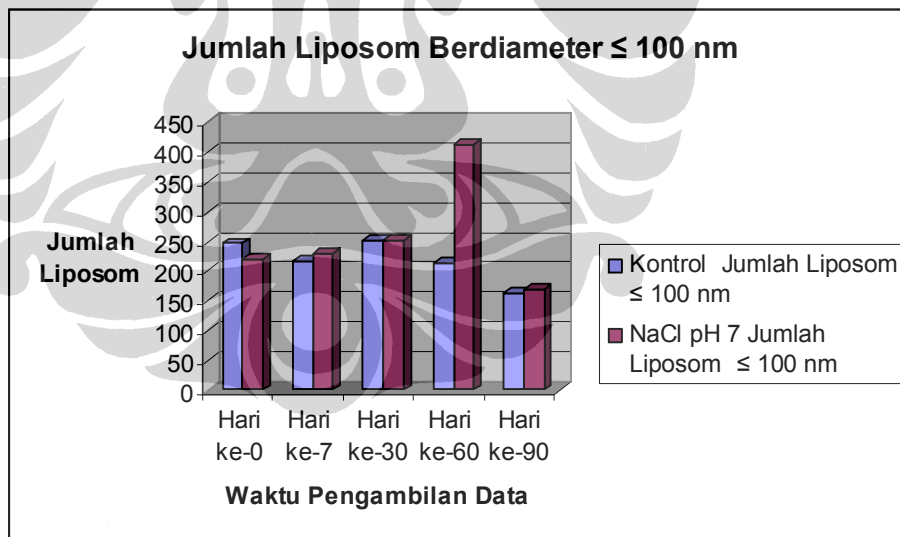
Tabel 1. Data Ukuran Liposom pada Hari ke-0, 7, 30, 60 dan 90

Waktu Pengambilan Data		Kontrol		NaCl pH 7	
		Jumlah Liposom > 100 nm	Jumlah Liposom ≤ 100 nm	Jumlah Liposom > 100 nm	Jumlah Liposom ≤ 100 nm
Hari ke-0	Data 1	9	299	1	219
	Data 2	4	215	0	171
	Data 3	39	227	17	268
	Rata-rata	17,33	247	6	219,33
Hari ke-7	Data 1	0	224	20	252
	Data 2	1	218	8	227
	Data 3	0	209	9	209
	Rata-rata	0,33	217	12,33	229,33
Hari ke-30	Data 1	115	287	39	317
	Data 2	3	180	5	197
	Data 3	12	286	36	244
	Rata-rata	43,33	251	26,67	252,67
Hari ke-60	Data 1	9	349	2	662
	Data 2	0	61	0	98
	Data 3	21	231	9	479
	Rata-rata	10	213,67	3,67	413
Hari ke-90	Data 1	17	269	91	232
	Data 2	5	60	0	60
	Data 3	14	161	67	216
	Rata-rata	12	163,33	52,67	169,33

Dari data yang didapatkan mulai dari hari ke-0 hingga hari ke-90, terdapat fluktuasi jumlah liposom yang berukuran > 100 nm dan ≤ 100 nm pada kedua perlakuan (kontrol dan dengan penambahan NaCl 150 mOsmol pH 7). Hal ini dapat dilihat pada Gambar 11 dan 12.



Gambar 11. Jumlah Liposom Berdiameter >100 nm



Gambar 12. Jumlah Liposom Berdiameter ≤ 100 nm

Dari Gambar 11 terlihat bahwa liposom tanpa perlakuan (kontrol) memiliki jumlah vesikel yang berukuran >100 nm paling banyak pada hari ke-30, sedangkan untuk liposom dengan NaCl 150 mOsmol pH 7 memiliki jumlah vesikel >100 nm paling banyak pada hari ke-90. Untuk liposom yang berdiameter

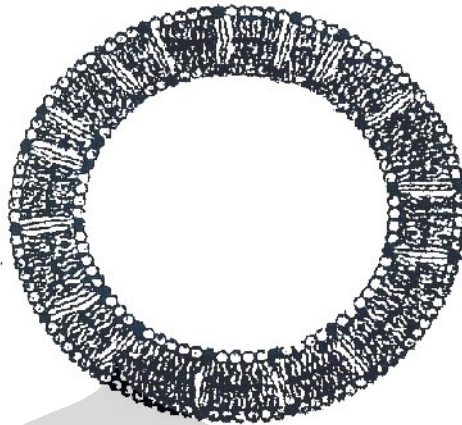
≤ 100 nm (Gambar 12) pada kedua perlakuan menunjukkan jumlah yang hampir sama pada hari ke-0, 7, 30, dan 90. Akan tetapi, pada hari ke-60 terdapat peningkatan jumlah vesikel yang signifikan pada liposom dengan NaCl 150 mOsmol pH 7. Berdasarkan data yang ditunjukkan dalam grafik ini, didapatkan kesan bahwa liposom yang diberikan perlakuan maupun tidak memiliki sifat yang kurang stabil. Oleh karena itu untuk memastikan apakah liposom-liposom ini stabil atau tidak secara kimiawi, maka dilakukanlah pengolahan data dengan menggunakan analisis statistik Non-parametrik.

Ukuran liposom >100 nm merupakan indikator perubahan kestabilan liposom pada penelitian ini. Data liposom berukuran > 100 nm akan diolah diolah menggunakan metode analisis statistik Non-Parametrik yaitu Kruskal-Wallis 1-way ANOVA, sedangkan untuk liposom yang berukuran ≤ 100 nm tidak dianalisis dalam penelitian ini. Metode analisis ini digunakan untuk membandingkan kestabilan antara liposom kontrol dengan liposom NaCl 150 mOsmol pH 7.

Dari hasil analisis menggunakan metode Kruskal-Wallis seperti yang tercantum dalam Lampiran 3, dapat terlihat nilai p sebesar 0,332, hal ini menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna dalam kestabilan liposom pada setiap perlakuan selama penelitian.

Seiring dengan berjalannya waktu, berbagai perubahan liposom dapat ditemukan, seperti terjadinya degradasi kimia (oksidasi dan hidrolisis) yang menyebabkan penggumpalan dan pecahnya isi liposom²⁰. Akan tetapi perubahan ini tidak ditemui pada liposom EPC-TEL 2,5 hingga 90 hari penyimpanan. Struktur TEL yang digunakan dalam formulasi ini yang memungkinkan tidak terjadinya perubahan tersebut.

TEL yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum* memiliki struktur berupa 2 gugus kepala polar (*polar head group*) dengan tebal membran sekitar 4 nm (dari ujung kepala satu ke ujung kepala lain), sehingga diharapkan akan dapat berinkorporasi dengan membran liposom EPC yang menyerupai pasak seperti pada Gambar 13^{28, 38-40}.



Gambar 13. Gambar skematis inkorporasi TEL pada membran liposom EPC^{28, 38-40}

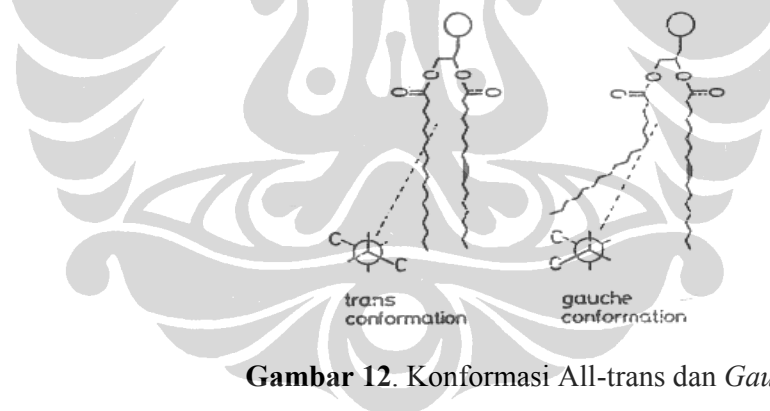
Uji stabilitas liposom yang berasal dari TEL *Thermoplasma acidophilum*, seperti yang dilakukan oleh Freisleben HJ²⁸, diketahui bahwa liposom yang tersusun dari TEL murni maupun liposom kombinasi lesitin telur dan TEL konsentrasi tinggi terbukti memiliki kestabilan yang cukup tinggi, bahkan dapat disimpan dalam waktu tak terhingga dan tidak dapat dipenetrasi oleh proton jika konsentrasi TEL mencapai 100%. Selain itu, penelitian Freisleben HJ lainnya²⁹, menyatakan bahwa liposom dengan TEL *Thermoplasma acidophilum* terbukti cukup stabil pada pH rendah dibandingkan pada pH netral maupun alkalis. Kemampuan untuk menambah muatan negatif pada permukaan membran liposom, juga menjadikan struktur liposom lebih stabil.

Penggunaan TEL sebanyak 2,5 mol% dalam penelitian ini, lebih disebabkan oleh faktor keamanannya untuk pemakaian jangka panjang. Walaupun TEL *Thermoplasma acidophilum* sudah terbukti tidak toksik secara *in-vivo* dan *in-vitro*, akan tetapi hingga saat ini, mekanisme pemecahan dan metabolisme TEL di dalam tubuh belum diketahui mekanismenya secara *in-vivo*^{30,38,41}.

Selain faktor TEL yang digunakan dalam pembuatan liposom, pH, temperatur, serta ukuran juga turut berpengaruh pada kestabilan yang terjadi¹⁴. pH netral berfungsi untuk memperlambat proses hidrolisis yang terjadi, akibatnya struktur dari liposom dapat bersifat lebih stabil

Penyimpanan liposom pada suhu yang rendah sekitar 4°C memungkinkan liposom tersebut untuk disimpan dalam jangka waktu tak terhingga tanpa mempengaruhi kestabilannya. Akan tetapi, proses penyimpanan dalam suhu rendah ini tetap menimbulkan masalah yaitu menyebabkan kerusakan liposom dengan cara dehidrasi osmotik. Dehidrasi ini terjadi ketika cairan ekstraliposom menarik keluar cairan yang terdapat di dalam ruangan inti liposom⁷.

Pendinginan juga menyebabkan perubahan temperatur transisi liposom, hal ini menimbulkan agregasi liposom, terbentuknya MLV dari SLV serta pecahnya isi liposom^{7,14}. Pada umumnya, temperatur transisi sangat dipengaruhi oleh panjang rantai serta saturasi dari rantai lemak tersebut. Peningkatan saturasi dan panjang rantai meningkatkan temperatur transisi. Pada suhu yang meningkat, rantai asam lemak akan mengubah konformasinya dari rantai all-trans lurus menjadi konformasi *gauche* seperti yang terlihat pada Gambar 12. Struktur *gauche* ini mengurangi panjang rantai hidrokarbon serta menurunkan ketebalan membran. Akibatnya membran menjadi kurang rapat, dan kestabilannya menurun¹⁴.



Gambar 12. Konformasi All-trans dan *Gauche*¹⁴

Sonikasi yang dilakukan pada liposom EPC-TEL 2, 5 menghasilkan liposom dengan ukuran yang lebih kecil, yaitu sekitar 10-50 nm (SUV). Dengan ukuran yang lebih kecil, liposom dapat bersifat lebih stabil. Pada liposom dengan ukuran yang lebih besar, kemungkinan membran liposom yang satu berkontak dengan membran lainnya lebih besar, sehingga lebih memungkinkan untuk terjadinya penggumpalan. Selain itu liposom berukuran besar dapat mengalami sedimentasi akibat gaya Van der Waals.

Akan tetapi, beberapa kerugian tetap dapat terjadi akibat sonikasi yang dilakukan pada liposom, seperti sonikasi tetap memungkinkan terjadinya oksidasi pada lipid serta ukuran liposom yang kecil karena sonikasi menurunkan konsentrasi obat yang dapat dibawa oleh liposom tersebut. Sebagai contoh, liposom berukuran kecil yang disebut juga sebagai small-unilamellar vesicles, yang berukuran 25-30 nm, hanya mampu menangkap air sebesar 0,3 L per mol lipid dibandingkan dengan multi-lamellar vesicles yang mampu mengangkut 3 L per mol lipid⁴¹⁻⁴².

Cara lain yang dapat digunakan untuk meminimalisir proses oksidasi adalah dengan melakukan penambahan antioksidan pada struktur liposom (α -tokoferol dan asam fosfatidat), menghindari temperatur yang tinggi dalam proses pembuatan dan penyimpanannya serta menggunakan bahan-bahan penyusun liposom yang segar.

Garam NaCl 150 mOsmol pH 7 yang digunakan dalam penelitian ini bermanfaat sebagai pelarut liposom, sehingga liposom EPC-TEL 2,5 dimungkinkan untuk dapat dicampur ke dalam cairan infus larutan fisiologi NaCl 0,9% Garam ini merupakan komponen elektrolit utama dalam tubuh dan sering digunakan dalam terapi cairan intravena