

BAB III METODOLOGI

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro* dengan menambahkan garam NaCl 150 mOsmol pH 7 pada liposom EPC-TEL 2,5 yang telah disonikasi dan disimpan pada suhu 4⁰ C . Pengukuran dilakukan pada hari ke-0, 7, 30, 60 dan 90.

Penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan melibatkan empat laboratorium yaitu laboratorium Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran FKUI, laboratorium Biokimia FKUI , laboratorium Farmakologi dan laboratorium Fisika FKUI. Penelitian dimulai pada bulan April 2007 dan membutuhkan waktu sekitar 4 bulan, dimana 1 bulan diantaranya digunakan untuk persiapan penelitian.

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahap, dimulai dengan proses pembuatan preparat liposom EPC-TEL 2,5 dengan mengkombinasikan EPC dengan tetraeter lipid (TEL). Liposom kemudian disonikasi dengan menggunakan sonicator Branson untuk mendapatkan ukuran yang diinginkan. Larutan garam NaCl 150 mOsmol pH 7 dicampurkan dengan preparat liposom dan diinkubasi dalam waktu tertentu dalam suhu 4⁰C. Pengambilan sampel data dilakukan dengan menggunakan mikroskop yang disambungkan ke kamera Sony CCD-IRIS color video camera pada hari ke-0, 7, 30, 60 dan 90 inkubasi. Data yang diambil sebanyak 10 foto pada 10 lapang pandang (jumlah sampel data yang diambil minimal 3 kali sesuai rumus Federer).

3.1 Bahan Kimia

Fosfatidilkolin dari kuning telur (*egg-yolk Phosphatidylcholine* / EPC). Tetraeter lipid (TEL) dari *Thermoplasma Acidophilum* diperoleh dari IFB Halle, Jerman. Untuk semua bahan lipid disimpan di dalam suhu -80⁰ C. Chloroform 5 ml dan Ethanol 70% 5 ml sebagai pelarut dalam pembuatan liposom EPC-TEL 2,5 diperoleh dari laboratorium farmasi FKUI. Penanda bercak berupa Quinakrin 0,05%. Aquabides. Larutan NaCl 150 mOsmol pH 7. Alkohol 95% untuk membersihkan kaca preparat dan buchi rotavapor.

3.2 Peralatan

Rotavapor, pompa vakum, penangas air dan gelas labu dari Büchi untuk membuat liposom. 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 sebanyak 2 buah. Spuit 2,5 mL.

Selain peralatan di atas, digunakan juga neraca listrik AE-200 dan pHmeter. Kaca preparat berskala “Olympus”, kaca penutup dan kertas saring untuk membersihkannya. Pipet dengan ujung biru serta Hamilton Syringe 25 mikroliter.

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Pembuatan Larutan NaCl 150 mOsmol pH 7

Larutan NaCl 150 mOsmol dibuat dengan cara mencampurkan 175,5 mg garam NaCl ke dalam cairan aquabidestilasi. Derajat keasaman larutan yang dikehendaki didapatkan dengan menambahkan larutan NaOH dan HCL. Jika pH larutan > 7 , maka larutan tersebut harus ditambahkan larutan HCL dan sebaliknya jika pH larutan < 7 , maka larutan ditambahkan larutan NaOH. Setelah didapatkan derajat keasaman yang diinginkan, larutan ini ditambahkan lagi cairan aquabidestilasi hingga mencapai volume 20 ml (sesuai dengan perhitungan).

3.3.2 Pembuatan Preparat Liposom

Larutan liposom yang dibutuhkan adalah sebanyak 50 ml. Dalam setiap 1 ml larutan liposom dibutuhkan EPC sebanyak 10 mMolar, sehingga massa EPC yang dibutuhkan 390 mg. TEL yang dibutuhkan sebanyak 2,5 % dari mMolar EPC, sehingga TEL yang dibutuhkan sebanyak 0,25 mMolar atau sebanyak 18,605 mg.

- Buchi Rotavapor dipanaskan, kemudian tuang air ke dalam *waterbath* dengan jumlah yang sesuai agar labu dapat terendam.
- EPC dan TEL (kadar TEL 2,5% dari mol EPC) ditimbang sesuai dengan perhitungan.

- EPC dan TEL dicampur kemudian ditambahkan Cloroform dan etanol ke dalamnya dengan perbandingan 1:1 (masing-masing 5 ml).
- Masukkan campuran EPC-TEL, Cloroform, Etanol ke dalam labu yang berisi *beads*.
- Campuran didispersikan dengan Buchi Rotavapor selama 2 jam. Air di dalam waterbath harus bersuhu 40 °C dan tekanan pada vakum dipertahankan 200 barr dan setelah kering tekanan pada vakum dipertahankan di bawah 50 barr. Proses pendispersian atau pencampuran bahan-bahan tersebut dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Proses pencampuran dan pengeringan liposom

- Setelah campuran mengering seperti terlihat pada Gambar 8, ditambahkan Aquades hingga volume mencapai 50 ml (sesuai dengan volume yang dibutuhkan), kemudian rotasi kembali sampai homogen.



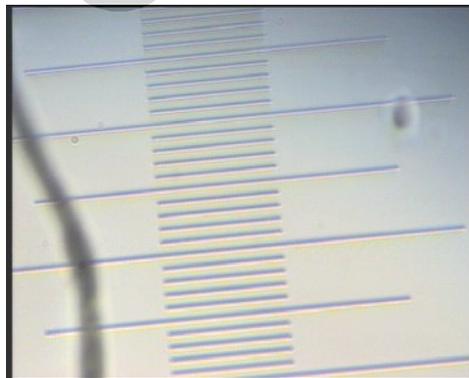
Gambar 8. Liposom yang telah mengering

- Campuran yang homogen dibagi menjadi 3 bagian (masing-masing berisi 15 ml) kemudian dilabel menjadi sampel I (kontrol), II (sonikasi) dan III (ekstrusi).
- Sampel II diberikan perlakuan berupa sonikasi yang dilakukan di Departemen Farmakologi FKUI selama 100 menit.
- Setelah diberikan perlakuan, ditambahkan *Quinakrin* pada sampel sonikasi sesuai dengan perhitungan
- Liposom yang telah disonikasi dan diberi *Quinakrin* dibagi menjadi 2 bagian masing-masing sejumlah 2 ml. Kemudian, kedua bagian tersebut dilabel dengan label Kontrol dan NaCl pH 7
- Tambahkan larutan NaCl pH 7 dengan perbandingan 1:1 pada liposom yang sesuai dengan labelnya, kecuali kontrol

3.3.3 Pengukuran dan Perhitungan Liposom

Perhitungan jumlah liposom dan perkiraan ukuran liposom dilakukan secara manual berdasarkan skala ukur yang telah ditentukan. Sehingga didapatkan 2 kategori ukuran liposom: ≤ 100 nm dan >100 nm. Pengukuran dan penghitungan jumlah liposom dilakukan pada hari ke-0, 7, 30, 60 dan 90 sesuai dengan langkah berikut:

1. Kaca preparat dibersihkan menggunakan alkohol 70% dan mikroskop dipersiapkan untuk pengambilan data
2. Garis ukur ditentukan untuk mengukur besar liposom. Garis ukur yang digunakan seperti pada Gambar 9



Gambar 9. Garis Ukur

3. 25 μ L liposom yang telah dicampur dengan *Quinakrin* diteteskan pada kaca preparat.
4. Kaca preparat yang sudah ditetesi liposom ditutup dengan kaca penutup, kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x (dapat disesuaikan).
5. Menentukan fokus, kemudian catat fokus yang didapat.
6. Ambil 10 foto, kemudian rekam dengan durasi 15 detik. Simpan data yang didapat.
7. Langkah 1-6 diulangi lagi pada tiap sampel yang diuji
8. Setelah seluruh sampel didapatkan, hitung jumlah liposom yang berukuran ≤ 100 nm dan >100 nm.

Setelah selesai dilakukan pengukuran dan penghitungan jumlah liposom, selanjutnya data yang didapat dianalisis dengan metode analisis statistik Kruskal- Wallis 1-way ANOVA yang merupakan suatu metode analisis untuk data Non-Parametrik, dengan batas kemaknaan $p=0,05$. Pengolahan data akan menggunakan program SPSS ver.11.5.