

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

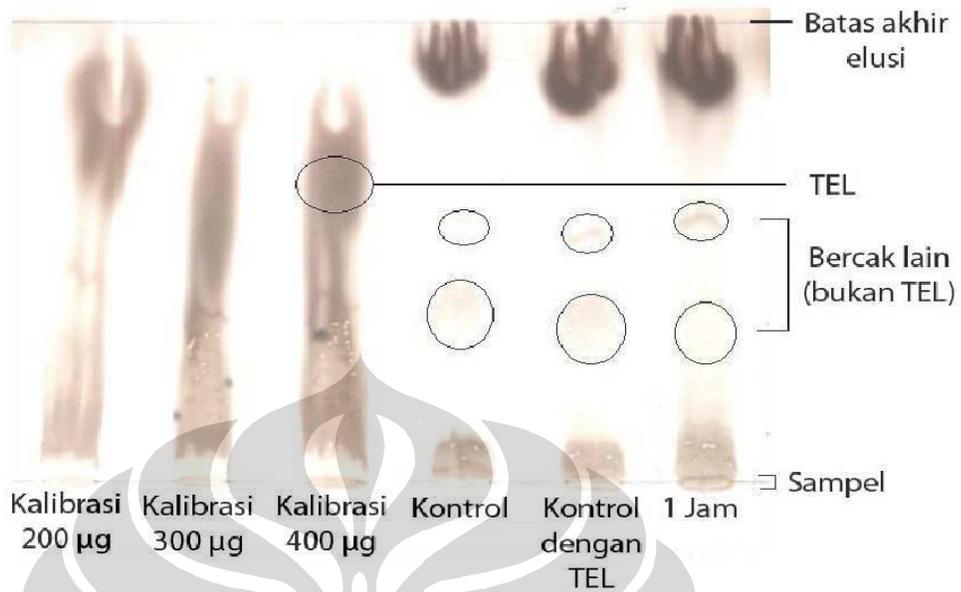
Kromatografi lapis tipis (KLT) dapat memberikan informasi yang baik tentang kemurnian dan konsentrasi lipid. Apabila substrat merupakan lipid yang murni, maka pada hasil kromatografi akan tampak sebagai bercak tunggal. Lipid yang telah mengalami degradasi akan tampak sebagai *smear* yang panjang, berupa bercak-bercak yang tersusun berurutan mengiringi bercak murninya, yang jika dibandingkan, tampak sebagai suatu bercak tunggal yang jelas.³

Identifikasi bercak TEL dilakukan dengan membandingkan bercak yang terbentuk pada kelompok kontrol dengan TEL dan perlakuan dengan bercak pada kelompok kontrol. Suatu bercak pada kelompok perlakuan dikatakan bercak TEL jika bercak mempunyai R_f yang sama dengan R_f bercak pada kontrol dengan TEL, tetapi bercak yang sama tidak terdapat pada kontrol.

Liposom TEL dianggap terdegradasi apabila pada lembar KLT kelompok perlakuan mempunyai lebih banyak bercak jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan TEL, sehingga mempunyai lebih banyak R_f dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan TEL. Sedangkan R_f , merupakan jarak bercak dari titik awal dibagi jarak titik awal ke batas akhir elusi.

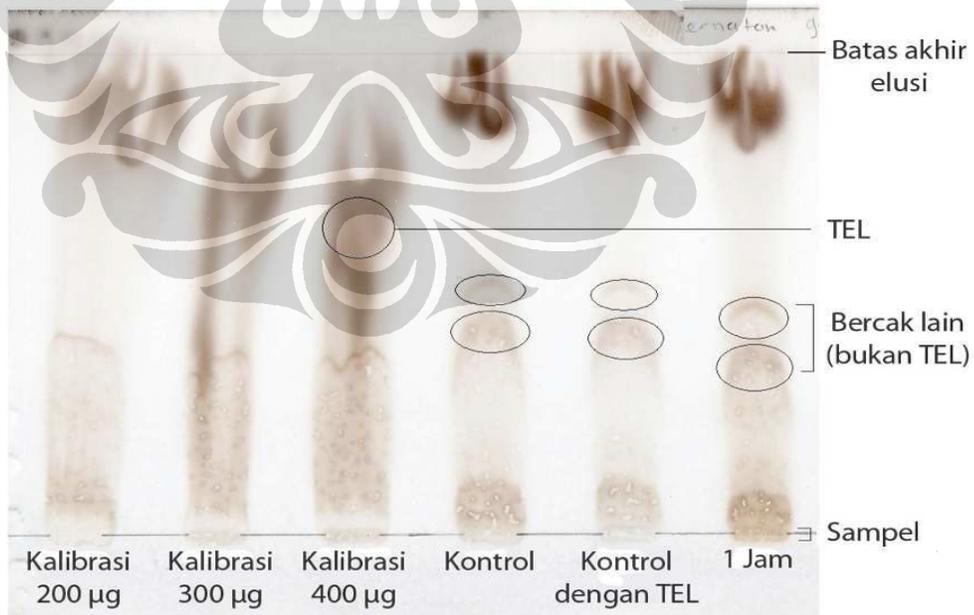
Berikut ini merupakan hasil KLT kalibrasi, supernatan kontrol, kontrol dengan TEL, dan kelompok perlakuan (1 jam).

Gelombang 1



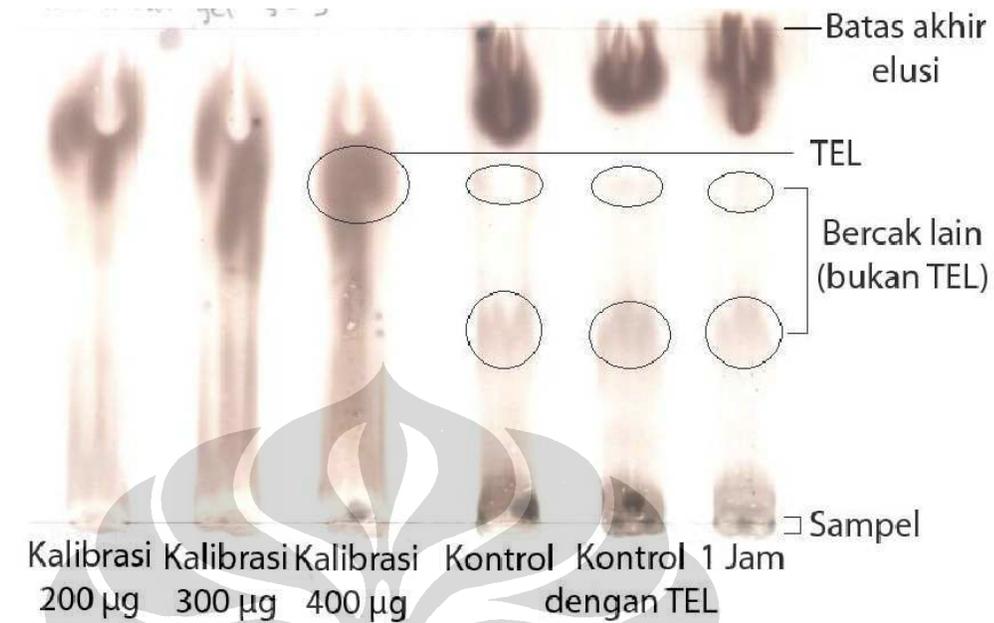
Gambar 6. Lembar KLT gelombang 1 berisi (berurutan dari kiri ke kanan) kalibrasi 1 (200µg), kalibrasi 2 (300µg), kalibrasi 3 (400µg), kontrol, kontrol dengan TEL, dan kelompok perlakuan 1 jam.

Gelombang 2



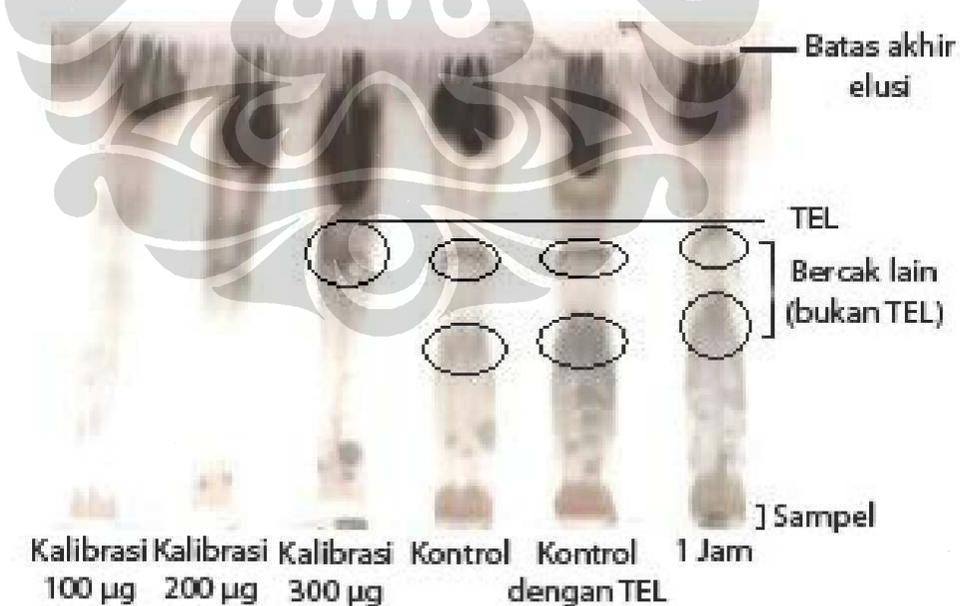
Gambar 7. Lembar KLT gelombang 2 berisi (berurutan dari kiri ke kanan) kalibrasi 1 (200µg), kalibrasi 2 (300µg), kalibrasi 3 (400µg), kontrol, kontrol dengan TEL, dan kelompok perlakuan 1 jam.

Gelombang 3



Gambar 8. Lembar KLT gelombang 3 berisi (berurutan dari kiri ke kanan) kalibrasi 1 (200µg), kalibrasi 2 (300µg), kalibrasi 3 (400µg), kontrol, kontrol dengan TEL, dan kelompok perlakuan 1 jam.

Gelombang 4



Gambar 9. Lembar KLT gelombang 4 berisi (berurutan dari kiri ke kanan) kalibrasi 1 (100µg), kalibrasi 2 (200µg), kalibrasi 3 (300µg), kontrol, kontrol dengan TEL, dan kelompok perlakuan 1 jam.

Gambar 6, 7, 8, dan 9 merupakan hasil KLT. Lembar KLT pada semua gelombang menampakkan hasil yang sama. Lembar KLT berisi 3 kalibrasi dengan jumlah TEL yang berbeda, kontrol yang berupa ekstraksi jaringan hepar kontrol, kontrol dengan TEL yang berupa ekstraksi jaringan hepar kontrol yang ditambahkan liposom EPC-TEL 2,5 secara *in vitro*, dan yang terakhir adalah hepar dengan perlakuan, yaitu hepar mencit yang diambil 1 jam setelah injeksi EPC-TEL 2,5 secara intraperitoneal.

Hasil kromatografi menunjukkan adanya bercak TEL pada kalibrasi. Gambaran TEL pada kalibrasi tampak sebagai apusan. Hal ini terjadi karena TEL dari *Thermoplasma acidophilum* memiliki 9 bercak yang berurutan, sesuai dengan hasil penelitian pendahuluan yang telah Purwaningsih lakukan.⁸ Pada kelompok perlakuan juga tampak suatu bercak, akan tetapi dengan *Rf* yang berbeda dengan bercak TEL pada kalibrasi. Bercak pada kelompok perlakuan ini tidak dapat dinyatakan sebagai bercak TEL yang utuh atau pun metabolitnya. Bercak ini tidak dapat dinyatakan sebagai metabolit TEL yang telah terdegradasi karena bercak yang sama juga terdapat pada kontrol. Adapun bercak pada kontrol dengan TEL, tidak dapat digunakan sebagai pembandingan pada kelompok perlakuan karena tidak tampak bercak yang dapat teridentifikasi sebagai TEL. Selain itu, semua bercak pada kontrol dengan TEL juga terdapat pada kelompok perlakuan dan kontrol.

Sehingga secara garis besar dapat dikatakan bahwa bercak yang terdapat baik pada kelompok kontrol dengan TEL maupun kelompok perlakuan bukan merupakan bercak TEL. Pada hasil kromatografi ini ada atau tidaknya bercak hasil degradasi TEL juga tidak dapat teridentifikasi. Bercak-bercak yang terdapat pada kontrol, kontrol dengan TEL, dan kelompok perlakuan kemungkinan merupakan zat yang berasal dari jaringan hepar karena bercak-bercak tersebut mempunyai *Rf* yang sama atau hampir sama pada seluruh kelompok dan pada penelitian ini bahan yang sama yang terdapat pada semua kelompok adalah hepar.

Oleh karena tidak teridentifikasinya bercak TEL pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan TEL, maka tidak ada bercak yang dapat dianalisa, baik secara kuantitatif maupun secara kualitatif untuk kemudian diuji

statistik. Sehingga dari hasil penelitian ini belum dapat disimpulkan terdegradasi atau tidaknya TEL secara *in vivo*.

4.2. Pembahasan

Dari hasil penelitian yang telah dikemukakan diatas, tidak tampak adanya bercak TEL baik pada kontrol dengan TEL, maupun pada kelompok perlakuan. Terdapat beberapa kemungkinan yang menyebabkan di lembar KLT tidak tampak bercak TEL pada kelompok kontrol dengan TEL dan kelompok perlakuan.

Kemungkinan yang menyebabkan tidak tampaknya bercak TEL pada kelompok perlakuan yaitu:

1. TEL telah terdegradasi di hepar.

TEL telah terdegradasi di hepar menjadi beberapa macam metabolit yang berbeda dengan jumlah masing-masing metabolitnya terlalu kecil, sehingga tidak dapat terdeteksi menggunakan KLT. Hal ini disebabkan oleh sensitivitas KLT yang terbatas. KLT umumnya dapat mendeteksi suatu senyawa dengan konsentrasi di atas 1mg/L.²³

Selain itu juga terdapat kemungkinan TEL telah terdegradasi di hepar, akan tetapi karena ketidaksesuaian eluen dan panjang lembar KLT maka bercak menjadi tidak tampak.

Seharusnya untuk mendapatkan suatu komposisi eluen yang tepat untuk suatu zat atau senyawa diperlukan suatu percobaan pendahuluan yang berulang-ulang dengan sampel yang sama dan eluen yang berbeda-beda. Akan tetapi karena jenis dan sifat metabolit dari TEL juga belum diketahui maka sangat sulit untuk memprediksi eluen yang sesuai dan mencobanya. Percobaan untuk mengetahui eluen yang sesuai telah peneliti lakukan, akan tetapi tidak lebih dari 2 komposisi eluen dengan konsentasi yang berbeda yaitu kloroform-etanol 9:1 dan 6:4. Percobaan untuk mengetahui eluen yang sesuai berulang-ulang dengan sampel sama tidak dapat dilakukan pada penelitian ini karena jumlah sampel yang terbatas.

Panjang lembar KLT juga kemungkinan berpengaruh. Diperkirakan lembar KLT kurang panjang sehingga belum semua hasil bercak muncul dan masih terkumpul pada akhir elusi. Mengingat bahwa belum diketahuinya metabolit TEL beserta sifat dan *R_f*, maka belum dapat

diperkirakan dimana kemungkinan bercak metabolit akan berada. Terdapat kemungkinan bahwa sifat kepolaran metabolit membuatnya masih belum terisolasi pada fase diam dan masih berjalan keatas bersama-sama dengan eluen, akan tetapi dengan lembar yang kurang panjang, maka perjalanan eluen dan zat sampel akan terhenti, zatnya belum sempat terisolasi pada R_f tertentu, sehingga tidak menampakkan bercak.

2. Jumlah TEL yang sampai ke hepar terlalu kecil.

Hal ini dapat disebabkan oleh banyak faktor. Dosis TEL yang diinjeksikan secara intraperitoneal terlalu kecil, oleh karena itu jumlah TEL yang sampai ke hepar juga terlalu kecil sehingga tidak dapat terdeteksi pada lembar KLT.

Selain itu, perlu diketahui bahwa pada injeksi intraperitoneal, makrofag yang menembus masuk ke dalam rongga intraperitoneal akan mengambil liposom dalam jumlah yang besar.³ Juga kenyataan bahwa liposom secara pasif akan tertuju pada sel-sel fagosit sistem RES.³ Secara *in vivo*, tanpa mempertimbangkan variasi pada komponen membran, liposom akan berinteraksi secara khusus dengan organ-organ RES, yaitu hepar, limpa, paru, nodus limfatikus, dan sumsum tulang.³ Liposom secara cepat ditangkap oleh sel-sel fagositik dan didegradasi dalam lisosom.³

Sedangkan jumlah TEL yang diberikan secara intraperitoneal adalah 148,8 µg. Sebesar 148,8 µg TEL dalam sirkulasi akan tersebar ke organ-organ RES, termasuk diantaranya adalah hepar. Sehingga pada hepar, TEL yang ada bukan dalam jumlah yang utuh, akan tetapi dalam jumlah yang telah terbagi.

Kemudian, dari hepar mencit yang ada, hanya sekitar 1/5 nya yang selanjutnya diekstraksi. Setelah itu hasil ekstraksi dilarutkan dengan 300µL campuran kloroform-metanol 2:1, akan tetapi yang diaplikasikan pada lembar KLT adalah 20 µL. Sehingga jumlah TEL yang ada semakin terbagi dan terlalu sedikit untuk dapat terdeteksi menggunakan KLT.

3. Kesalahan pada injeksi peritoneal

Faktanya, pada injeksi intraperitoneal terdapat kemungkinan kesalahan pada penempatan substrat yang diinjeksikan. Merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Arioli dan Rossi didapatkan bahwa terdapat perbedaan dalam injeksi intraperitoneal pada mencit yaitu antara prosedur yang dilakukan oleh 1 orang atau 2 orang.²⁴ Pada prosedur 1 orang ditemukan 12% kesalahan penempatan menggunakan injeksi intraperitoneal, sedangkan dengan prosedur 2 orang insidens kesalahan berkurang menjadi 1,2%.²⁴ Pada penelitian ini dilakukan prosedur injeksi intraperitoneal yang dilakukan oleh 2 orang sehingga diharapkan dapat meminimalisasi kemungkinan kesalahan yang ada. Akan tetapi, tetap saja masih terdapat kemungkinan kesalahan sebanyak 1,2%. Penelitian yang dilakukan Steward dan kawan-kawan menunjukkan bahwa dari 150 mencit yang diinjeksi oleh orang-orang yang telah berpengalaman, pada 21 (14%) mencit menunjukkan semua atau sebagian inokulum yang diinjeksikan berada di tempat selain rongga peritoneal. 13 kasus terdapat pada lumen lambung atau usus halus, 4 terdapat pada subkutan, 3 di retroperitoneal, dan 1 terinjeksi intravaskular.²⁵

Adapun kemungkinan yang menyebabkan tidak adanya bercak TEL pada kelompok kontrol dengan TEL yaitu:

1. TEL telah terdegradasi ketika proses homogenasi.

Hepatosit memiliki lisosom yang di dalamnya mengandung enzim-enzim hidrolitik, yang mengkatalisis reaksi hidrolisis.^{26,27} Reaksi ini memecahkan molekul organik yang masuk ke dalam sel.²⁷ Enzim-enzim pada lisosom menyerupai enzim hidrolitik pada sistem pencernaan, sehingga lisosom juga disebut sebagai sistem pencernaan intraselular.²⁷ Pada hepatosit, retikulum endoplasma (RE) halus mempunyai kemampuan yang spesial. RE halus ini, pada hepatosit mempunyai enzim yang berperan dalam detoksifikasi substansi-substansi luar yang masuk ke dalam tubuh.²⁷

Liposom EPC-TEL 2,5 diberikan secara *in vitro* pada hepar kontrol pada saat proses homogenasi. Ketika proses homogenasi, jaringan hepar

dihancurkan sehingga kemungkinan enzim yang terdapat dalam lisosom dan RE halus hepatosit dapat keluar dan mendegradasi TEL yang telah diberikan. Akan tetapi metabolit-metabolit hasil degradasi masing-masing mempunyai jumlah yang kecil sehingga tidak terdeteksi menggunakan KLT. Juga terdapat kemungkinan ketidaksesuaian eluen dan panjang lembar KLT sehingga bercak tidak nampak dengan alasan-alasan yang sama dengan yang tercantum sebelumnya.

2. Jumlah liposom EPC-TEL 2,5 yang diberikan secara *in vitro* pada hepar kontrol terlalu kecil.

Jumlah liposom yang diberikan secara *in vitro* pada hepar kontrol terlalu kecil. Jumlah TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 yang diberikan adalah 148,8 µg. Sehingga, tanpa mempertimbangkan terdegradasi atau tidak, TEL tidak dapat terdeteksi pada lembar KLT. Ini dapat dibandingkan dengan kalibrasi TEL dengan kadar 200µg, pada Lembar KLT didapatkan gambaran bercak yang sangat halus. Maka kemungkinan tidak tampaknya TEL akibat kecilnya dosis menjadi semakin nyata, karena dengan kadar yang TEL yang lebih besar (200µg) gambaran bercak tampak sangat halus, sehingga dengan kadar TEL yang lebih kecil yang diberikan secara *in vitro* (148,8 µg), bercak TEL pada lembar KLT menjadi tidak tampak.

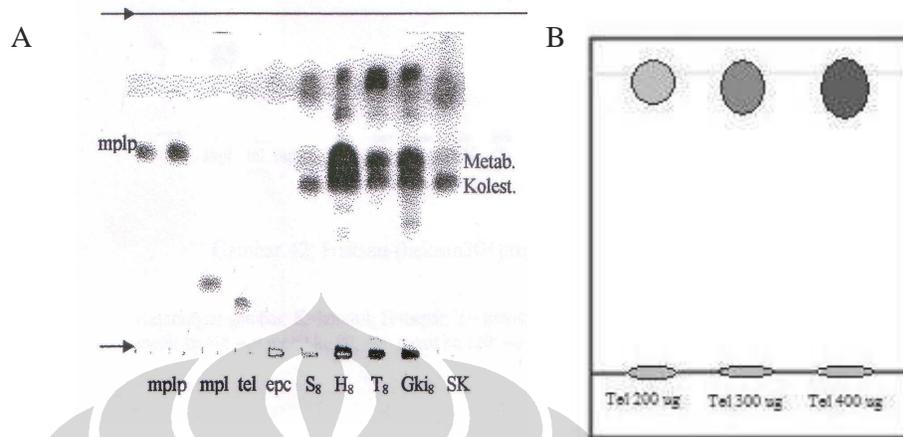
Jika kemungkinan-kemungkinan tidak tampaknya bercak TEL atau pun metabolitnya di atas dianalisa secara keseluruhan (tidak terpisah) baik pada kelompok perlakuan maupun pada kelompok kontrol dengan TEL, kemungkinan tidak tampaknya bercak TEL pada kelompok perlakuan karena jumlah TEL yang sampai ke hepar kecil disebabkan adanya distribusi ke organ selain hepar, dapat dikatakan sangat kecil. Juga kemungkinan adanya kesalahan pada injeksi intraperitoneal. Karena jika dibandingkan, pada kelompok kontrol dengan TEL yang diberikan liposom secara *in vitro*, yang tentunya akan membuat liposom sampai ke hepar dengan jumlah yang utuh (kurang lebih 100% dari yang diberikan), bercak TELnya juga tidak terlihat. Sehingga, kemungkinannya sangat

kecil jika alasan tidak tampaknya bercak pada kelompok perlakuan adalah jumlah TEL yang sampai ke hepar sangat kecil dan atau adanya kesalahan dalam injeksi.

Oleh karena itu, alasan yang paling besar kemungkinannya adalah TEL terdegradasi baik pada kelompok perlakuan, maupun pada kontrol dengan TEL, akan tetapi sedikitnya jumlah masing-masing metabolit sehingga tidak dapat terdeteksi menggunakan KLT.

Selain itu, ketidaksesuaian eluen dengan TEL dan metabolitnya juga dapat menyebabkan tidak tampaknya bercak TEL dan metabolitnya. Pemisahan zat menggunakan KLT terjadi karena substansi yang akan dipisahkan memiliki perbedaan afinitas terhadap fase diam dan fase gerak, sehingga masing-masing substansi bergerak dengan laju yang berbeda. Oleh karena itu, untuk dapat memisahkan campuran zat dengan baik, maka komposisi eluen yang digunakan harus disesuaikan dengan sifat substansi yang akan dipisahkan.¹⁵ Demikian pula pada penelitian ini, untuk memisahkan dan memunculkan bercak metabolit hasil degradasi TEL, komposisi eluen yang digunakan harus disesuaikan dengan sifat metabolit TEL. Namun hingga saat ini produk standar hasil degradasi TEL sebagai standar pengukuran belum tersedia, sehingga eluen yang ideal untuk memisahkan metabolit TEL belum diketahui.¹³ Untuk mengetahui jenis dan komposisi eluen yang sesuai, idealnya dilakukan percobaan KLT menggunakan berbagai eluen yang berbeda hingga ditemukan eluen yang paling sesuai. Percobaan untuk mengetahui eluen yang sesuai telah peneliti lakukan, akan tetapi tidak lebih dari 2 komposisi eluen dengan 3 konsentrasi yang berbeda yaitu kloroform-etanol 9:1, 7:3, dan 6:4, karena jumlah TEL yang tersedia untuk pembuatan liposom pada penelitian ini terbatas. Eluen dengan komposisi kloroform-etanol 9:1 pada penelitian ini merujuk pada penelitian terdahulu mengenai liposom EPC-TEL 2,5 oleh Purwaningsih, yang menggunakan TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius*. Pada penelitian tersebut, bercak TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* dapat terlihat jelas dan menunjukkan R_f 0,16.²⁸ Sedangkan pada penelitian pendahuluan yang penulis lakukan, pada KLT dengan menggunakan eluen kloroform:etanol 9:1, R_f bercak TEL dari *Thermoplasma acidophilum* mendekati 1, bercak terletak sangat dengan dengan batas akhir elusi, sehingga menyulitkan pembacaan bercak. Gambar berikut ini menunjukkan perbandingan

antara *Rf* bercak TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* dan TEL dari *Thermoplasma acidophilum*.



Gambar 10. Perbandingan bercak TEL. Gambar 10.A menunjukkan bercak TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* menggunakan eluen kloroform-etanol 9:1 pada penelitian Purwaningsih, dengan *Rf* 0,16.²⁸ Gambar 10.B menunjukkan bercak TEL dari *Thermoplasma acidophilum* pada penelitian ini menggunakan eluen kloroform-etanol 9:1, dimana bercak terletak dekat dengan batas akhir elusi, sehingga menyulitkan pembacaan.

Dari perbandingan gambar diatas dapat dipikirkan adanya perbedaan sifat kepolaran TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* dan TEL dari *Thermoplasma acidophilum*. Dengan eluen yang sama TEL dari *Thermoplasma acidophilum* lebih mudah terbawa oleh dibandingkan TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius*. Berdasarkan hasil percobaan di atas, TEL yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum* diduga bersifat lebih non polar dibandingkan TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius* karena afinitasnya terhadap eluen kloroform-etanol 9:1 yang lebih tinggi dibandingkan afinitas TEL *Sulfolobus acidocaldarius* terhadap eluen yang sama, sehingga bercak TEL baru berhenti (terfiksasi) mendekati batas akhir elusi. Sedangkan kloroform sendiri lebih bersifat non polar dibandingkan dengan etanol, kombinasi kloroform-etanol 9:1 sendiri mempunyai sifat non polar.

Percobaan eluen selanjutnya adalah dengan menggunakan kloroform-etanol 7:3. Dengan eluen tersebut, bercak TEL *Thermoplasma acidophilum* terlihat lebih baik dibandingkan dengan eluen kloroform-etanol 9:1 karena bercak terletak di bawah batas akhir elusi, meskipun pembacaan bercak masih sulit

dilakukan. Percobaan ini memperkuat dugaan bahwa TEL dari *Thermoplasma acidophilum* bersifat lebih non polar dibandingkan TEL dari *Sulfolobus acidocaldarius*. Karena dengan meningkatkan kepolaran eluen yaitu dengan menurunkan kadar klorofom dan menaikkan kadar etanol, TEL dari *Thermoplasma acidophilum* afinitasnya berkurang terhadap eluen yang ditandai dengan bercak yang lebih terletak dibawah batas akhir elusi dibandingkan bercak sebelumnya yang menggunakan eluen 9:1.

Sehingga berdasarkan hasil percobaan tersebut, untuk mendapatkan bercak TEL yang terletak lebih jauh di bawah dari garis batas elusi, maka dilakukan percobaan KLT menggunakan eluen yang lebih polar, yaitu kloroform-etanol 6:4. Dengan eluen tersebut bercak TEL kalibrasi terlihat lebih baik sehingga dapat dilakukan pembacaan bercak dan pengukuran *R_f*. Dengan demikian komposisi eluen yang digunakan dalam penelitian adalah kloroform-etanol 6:4, yang menghasilkan bercak TEL kalibrasi dengan rata-rata *R_f* 0,6. Namun eluen tersebut ternyata mungkin masih belum sesuai dengan metabolit dari TEL *Thermoplasma acidophilum*, sehingga bercak metabolit TEL tidak terlihat. Percobaan menggunakan metabolit dari TEL *Thermoplasma acidophilum* sendiri belum dapat dilakukan karena standar untuk metabolit TEL *Thermoplasma acidophilum* belum tersedia. Selain itu, metabolit TEL juga belum diketahui, sehingga sifat kepolaran dari metabolit TEL itu sendiri juga belum diketahui. Oleh karena itu, juga sulit untuk memperkirakan kombinasi eluen yang tepat itu metabolit TEL dari *Thermoplasma acidophilum*.

Disamping itu, kurang panjangnya lembar KLT, mungkin juga menyebabkan tidak tampaknya metabolit TEL pada lembar KLT, karena sifat kepolaran dan jenis metabolit belum diketahui sehingga mungkin saja metabolit bersifat tidak terlalu polar sehingga belum terfiksasi pada fase diam dan masih bergerak. Hingga ketika dihentikan, metabolit-metabolit tertumpuk pada batas akhir elusi.

Kemungkinan lainnya adalah dosis TEL yang diberikan terlalu kecil. Hal ini didukung oleh kenyataan bahwa pada liposom yang diberikan *in vitro*, yang langsung mencapai hepar dalam jumlah yang utuh, pun tidak menampakkan adanya bercak.

Pada pustaka disebutkan KLT dapat mendeteksi bahan-bahan dengan konsentrasi 1 – 5 ng dengan absorpsi dan 50 – 100 pg dengan fluoresensi.²⁹ Akan tetapi dengan konsentrasi melebihi 5 ng, bercak masih tidak terlalu tampak. Pada kalibrasi dengan jumlah TEL 200 µg (lebih besar dari yang terdapat pada liposom yang diberikan), bercak yang tampak sangat tipis. Sehingga dapat dibayangkan jika TEL yang diberikan adalah lebih kecil dari 200 µg, bercak akan tampak sangat tipis atau bahkan tidak terlihat. Sehingga rasanya dosis yang diberikan terlalu kecil untuk dapat terlihat menggunakan kromatografi lapis tipis.

