

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Pembawa Obat

Mencegah terjadinya kerja obat yang tidak diinginkan pada organ dan jaringan yang normal dan mengurangi efek samping dari terapi merupakan hal yang penting. Sehingga dibutuhkan obat dengan kerja selektif pada organ atau jaringan yang sesuai. Kenyataannya, banyak komponen yang secara farmokologis efektif tetapi tidak dapat digunakan sebagai obat karena efek kerjanya yang tidak diharapkan pada organ atau jaringan yang normal. Pada umumnya, obat-obat ini kurang terdistribusi pada seluruh tubuh dan untuk mencapai zona target harus melalui berbagai organ, sel, atau pun kompartemen intraselular dimana obat sebagian dapat terinaktivasi. Untuk mengatasi masalah ini, maka diberikan konsentrasi obat yang tinggi, yang berpotensi untuk menyebabkan komplikasi yang tidak diinginkan dan terkadang juga mahal.<sup>7</sup>

Solusi yang ideal terhadap masalah ini adalah mentargetkan obat-obat menggunakan suatu pembawa yang sesuai seperti protein serum, immunoglobulin, polimer sintetik, eritrosit, mikrosfer, farmakosom, niosom, dan liposom. Diantara pembawa-pembawa ini, liposom menampakkan potensi yang sangat baik dalam penghantaran obat yang efektif ke tempat kerja dan mengontrol pelepasan obat-obat ini dengan laju yang ditetapkan sebelumnya.<sup>7</sup>

Pembawa obat adalah substansi yang berfungsi sebagai mekanisme untuk meningkatkan penghantaran dan efektivitas obat. Persyaratan untuk suatu pembawa obat adalah tidak toksik, tidak bersifat imunogenik, tidak mutagenik, ataupun antimutagenik, biokompatibel, dan mudah terdegradasi dalam tubuh (*biodegradable*).<sup>8</sup>

Sistem-sistem penghantaran obat yang baru seperti liposom dikembangkan ketika formulasi yang ada tidak memuaskan dan reformulasi liposom memberikan keuntungan yang jelas dengan memperhatikan kemampuan mencapai target, keefektivan terapi, dan keamanan dibandingkan dengan formulasi yang telah ada. Kurangnya spesifisitas agen yang aktif secara farmakologis merupakan hambatan terhadap penggunaan yang efektif pengobatan dan penelitian biologis. Sehingga

kemudian dilakukan pendekatan apapun yang memungkinkan agen untuk mencapai targetnya secara selektif dan dalam cara yang terkontrol akan berkontribusi terhadap eliminasi masalah-masalah yang terdapat pada metode konvensional. Salah satu pendekatannya adalah perkembangan pembawa obat yang non-toksik dan dapat terdegradasi dalam tubuh (biodegradable).<sup>7</sup>

Telah banyak dibuktikan bahwa liposom dapat memenuhi persyaratan-persyaratan yaitu, formulasi liposom pada beberapa obat telah menunjukkan peningkatan yang signifikan pada efektivitas terapi dan atau indeks terapi pada model preklinis dan pada manusia dibandingkan dengan formulasi konvensional.<sup>7</sup>

## 2.2. Liposom

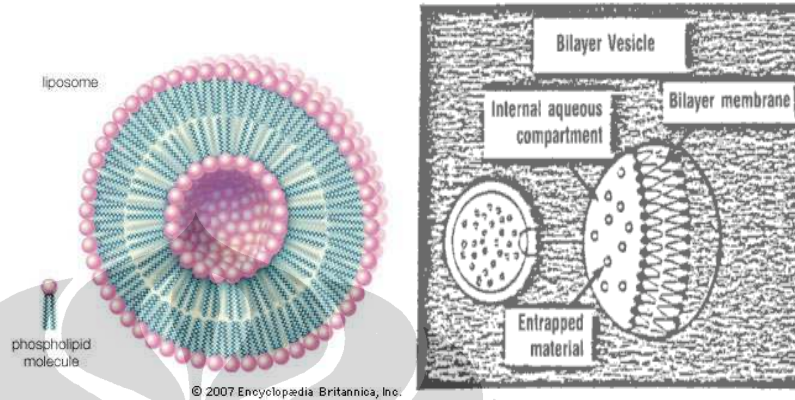
Liposom sejak tahun 1970an telah banyak diteliti sebagai pembawa obat untuk meningkatkan penghantaran agen terapi ke tempat spesifik dalam tubuh. Hasilnya, telah banyak kemajuan yang didapatkan, sehingga membuat teknologi ini secara potensial berguna untuk pengobatan beberapa penyakit.<sup>7</sup> Penggunaan liposom sebagai pembawa obat yang *biodegradable* atau biokompatibel untuk meningkatkan potensi dan mengurangi toksisitas terapeutik mulai dikenal.<sup>9</sup> Kesuksesan liposom sebagai pembawa obat telah terefleksi dalam banyaknya formulasi berbasis liposom, yang telah tersedia secara komersial ataupun yang sedang dalam percobaan klinis. Preparasi farmasetik yang baru pada sistem terapi berbasis liposom terutama disebabkan oleh pemahaman interaksi lipid-obat dan mekanisme pembawaan liposom. Pemahaman yang diperoleh dari penggunaan klinis sistem penghantaran obat liposom sekarang dapat diintegrasikan untuk merancang liposom yang dapat ditargetkan ke jaringan, sel, atau ruangan intrasel dengan atau tanpa ekspresi molekul pengenalan target pada membran liposom.<sup>7</sup>

Liposom merupakan suatu vesikel dimana volume cair secara keseluruhan terselubung oleh suatu membran yang terdiri atas molekul-molekul lipid (biasanya fosfolipid).<sup>3</sup> Umumnya liposom terdiri atas fosfatidilkolin dan dapat juga mengandung fosfatidil etanolamin, fosfatidilserin, sfingomielin, kolesterol dan lipid lain dengan atau tanpa bahan lain sebagai stabilisator membran.<sup>8</sup>

Sebagai pembawa obat, liposom dapat membawa molekul obat dengan berbagai cara yaitu, terikat dengan membran liposom, terinkalasi di antara dwipalis lipid, terlarut dalam dwilapis lipid atau terlarut di dalam vesikel. Molekul

obat dapat larut dalam air, terionisasi, atau membentuk kompleks hidrofob dengan asam nukleat atau makromolekul lain tanpa berikatan secara fisik.<sup>8</sup>

### 2.2.1. Struktur Liposom



Gambar 1. Liposom skematik. Gambar pada sebelah kiri menunjukkan gambaran liposom dengan molekul penyusunnya fosfolipid yang membentuk suatu membran dwilapis. Gambar pada sebelah kanan menunjukkan gambaran liposom dengan material yang dibawanya, yang terdapat di dalam liposom.<sup>10</sup>

Liposom merupakan suatu vesikel membran unilamellar atau multilamellar yang dibentuk dengan cara mendispersikan berbagai macam lipid terutama fosfolipid, baik alami atau sintetik ke dalam media cair, sehingga terbentuk vesikel spheris yang terdiri dari molekul hidrofilik yang dikelilingi oleh molekul hidrofobik, dan memiliki sifat-sifat yang memenuhi persyaratan sebagai pembawa obat.<sup>2,5</sup> Liposom terbentuk secara spontan apabila molekul-molekul lipidnya terdispersi di dalam media cair, membentuk populasi yang diameternya dapat bervariasi dari puluhan nanometer hingga puluhan mikron.<sup>3</sup>

Nilai liposom sebagai model sistem membran didasarkan pada fakta bahwa membran liposom membentuk struktur dwilapis yang identik dengan lipid pada membran sel alami yang terdiri dari fosfolipid (model Singer dan Nicholson).<sup>3</sup> Kesamaan antara liposom dan membran sel alami dapat ditingkatkan dengan modifikasi kimia dari membran liposom dan dapat dimanfaatkan sebagai pembawa obat menuju sasaran tertentu dan modulasi imun. Sifat liposom yang sama dengan membran alami dengan

jalur degradasi yang sama membuat liposom aman dan efektif untuk aplikasi medik.<sup>3</sup>

Liposom dapat dibuat dari bahan sintetik tertentu yang dipilih untuk meningkatkan efektivitasnya. Membran dwilapis yang stabil dapat dibuat dari berbagai macam lipid, seperti asam lemak atau derivat kolesterol. Karena komponen membran biologis yang paling utama adalah fosfolipid, maka fosfolipid merupakan bahan yang paling sering digunakan dalam pembuatan liposom.<sup>3</sup>

Jenis fosfolipid yang paling umum adalah fosfatidil kolin. Fosfatidil kolin, disebut juga lesitin, dapat dibuat dari bahan alami maupun sintetik. Umumnya fosfatidil kolin dibuat dari kuning telur dan kacang kedelai. Karena fosfatidil kolin merupakan komponen fosfolipid utama membran sel dengan harga yang relatif rendah dibandingkan fosfolipid lain, serta bermuatan netral, maka fosfatidil kolin dijadikan komponen utama liposom yang digunakan dalam aplikasi yang luas.<sup>3</sup>

Liposom dapat dibagi berdasarkan ukuran dan bentuknya. Semakin besar liposom semakin besar volume cairan yang dapat diselubunginya. Klasifikasi liposom berdasarkan ukuran merupakan karakterisasi yang paling umum digunakan saat ini. Liposom terbagi atas beberapa kategori yaitu:<sup>3</sup>

- *Multilamellar vesicle* (MLV). Biasanya terdiri atas populasi vesikel yang mempunyai kisaran ukuran yang luas (100-1000 nm), setiap vesikel umumnya mengandung 5 atau lebih *lamellae*. Vesikel yang hanya terdiri atas sedikit *lamellae* konsentris terkadang disebut liposom *oligo-lamellar*, atau vesikel *paucilamellar*.
- *Small unilamellar vesicle* (SUV). Merupakan liposom pada batas ukuran yang terkecil yang mungkin untuk vesikel fosfolipid. Batas ini sedikit bervariasi berdasarkan kekuatan ionik medium cair dan komposisi lipid membran.
- *Large unilamellar vesicle* (LUV). Liposom ini mempunyai diameter sekitar 1000 nm.

- *Intermediate-sized unilamellar vesicle (IUV)*. Merupakan liposom yang mempunyai diameter sekitar 100 nm.

### **2.2.2. Interaksi Liposom dengan Sel<sup>3</sup>**

Liposom dapat berinteraksi dengan sel melalui beberapa cara yang menyebabkan komponen-komponen liposom bersatu, yaitu:

#### **2.2.2.1. Transfer intermembran**

Transfer intermembran komponen-komponen lipid dapat terjadi ketika dua lapisan fosfolipid bertemu tanpa harus ada gangguan pada liposom dan integritas membran. Transfer intermembran memungkinkan retensi sempurna isi dari liposom yang berada di media cair. Pada transfer intermembran, materi lipofilik yang ada pada membran liposom dapat masuk ke dalam membran yang berdekatan dengan membran lain sehingga jarak antara kedua membran ini cukup untuk mencegah materi yang akan ditransfer terpecah oleh fase cair (cairan interstitial).

#### **2.2.2.2. Contact Release**

Cara ini dapat terjadi ketika membran sel dan membran liposom bertemu yang menyebabkan peningkatan permeabilitas membran liposom, sehingga terjadi pelepasan zat larut air dengan konsentrasi tinggi yang berada dekat dengan membran sel (*leakage*).

#### **2.2.2.3. Adsorpsi**

Adsorpsi liposom ke permukaan sel sering terjadi diikuti dengan sedikit atau tanpa internalisasi baik komponen lipid maupun komponen cair. Adsorpsi dapat terjadi karena gaya tarik, atau sebagai hasil dari ikatan reseptor spesifik terhadap ligan di membran vesikel (liposom). Diperkirakan bahwa adsorpsi fisik liposom dapat terjadi melalui ikatan dengan protein permukaan spesifik pada sel. Adsorpsi merupakan tahap penting sebelum ingesti liposom oleh sel-sel, akan tetapi faktor-faktor yang menentukan dikonsumsi atau tidaknya liposom baik melalui

pinositosis atau fagositosis, belum sepenuhnya diketahui. Beberapa studi menampakkan bahwa perlekatan liposom dengan membran sel melalui beberapa protein permukaan dapat menyebabkan ambilan yang cepat ke dalam sel.

#### **2.2.2.4. Fusi**

Interaksi antara liposom dan membran yang berjarak dekat satu sama lain dapat mengakibatkan fusi, yaitu penyatuan sempurna lipid pada liposom dengan membran plasma sel, sehingga isi liposom terpajan langsung dengan sitoplasma sel.

#### **2.2.2.5. Fagositosis**

Pengambilan liposom melalui fagositosis terjadi oleh beberapa tipe sel tertentu contohnya makrofag. Fagositosis terjadi melalui adsorpsi liposom yang diikuti invaginasi oleh membran sel dan diselubungi oleh membran plasma sel untuk membentuk endosom dimana liposom akan dibawa untuk berinteraksi dengan enzim-enzim lisosom yang dapat mendegradasi membran liposom. Setelah membran liposom terdegradasi, fosfolipid akan dihidrolisis menjadi asam lemak yang akan dimetabolisme kembali dan diinkorporasi ke dalam fosfolipid dari sel itu sendiri.

### **2.2.3. Perilaku Liposom di Dalam Tubuh**

Liposom yang diadministrasi *in vivo* mempunyai laju dan derajat pengambilan tertentu oleh organ yang dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti komposisi membran dan ukuran liposom.<sup>3</sup> Ukuran liposom berperan dalam menentukan tempat terjadinya interaksi dengan sel, sedangkan komposisi membran menentukan interaksi antara liposom dengan tipe sel tertentu, proses-proses lain seperti fusi, fagositosis, transpor sel ke sel.<sup>2</sup> Selain itu ukuran dan komposisi dari liposom menentukan jangka waktu liposom dapat bertahan di dalam sirkulasi darah.<sup>3</sup>

Dalam keadaan normal, ketika liposom yang terbuat dari fosfatidil kolin diinjeksi ke dalam sirkulasi darah, liposom tersebut akan diambil

dalam jumlah besar oleh organ-organ yang kaya akan RES. Sifat alamiah liposom yang secara pasif menuju sel fagositik pada RES membuat liposom terlokalisasi di organ-organ yang banyak mengandung RES, contohnya limpa, paru-paru, sumsum tulang, darah, ginjal, dan dalam jumlah besar di hepar.<sup>3</sup>

Pada hepar pengambilan liposom tergantung pada dosis dan saturasinya atau *blokade* dari liposom itu sendiri. Liposom berukuran besar akan menghambat pengambilan liposom yang berukuran besar. Liposom yang berukuran kecil akan menghambat pengambilan liposom yang berukuran kecil lainnya, selain itu liposom yang berukuran besar dapat mereduksi pengambilan liposom berukuran kecil, tetapi tidak sebaliknya.<sup>3</sup>

Liposom dapat dimasukkan dalam tubuh melalui berbagai cara, antara lain secara subkutan, intramuskular, oral, dan intravena. Liposom yang diberikan secara subkutan dan intramuskular akan tertahan di tempat injeksinya dan secara perlahan akan masuk menuju nodus limfe melalui sistem limfe, dimana liposom tersebut diambil oleh makrofag dan sebagian lainnya akan berinteraksi secara langsung dengan limfosit. Sementara itu liposom yang diberikan secara oral hampir semuanya terdegradasi sebelum melepaskan sebagian besar isinya ke dalam sistem limfe di usus. Tempat-tempat lain dalam tubuh dapat tercapai oleh liposom dengan pemberian lokal dan pada keadaan dimana lokasi secara anatomi terisolasi dari RES, seperti *aqueous humour* pada mata, pentargetan bermediasi reseptor dapat dilakukan. Pada liposom yang diinjeksi intraperitoneal, makrofag yang berada di rongga tersebut dan dapat pula yang berasal dari sirkulasi sistemik akan mengambil liposom dalam jumlah besar.<sup>2,3</sup>

Pada penyuntikan intravena, liposom ukuran kecil dapat melewati sinusoid hepar dan dengan cepat berinteraksi dengan hepatosit. Liposom ukuran sedang tertahan di dalam darah dan dapat bersirkulasi dalam waktu yang cukup lama. Liposom ukuran besar keluar lebih lambat dari sinusoid hepar dan secara cepat difagosit oleh sel Kuppfer di hepar. Liposom yang lebih besar lagi dikeluarkan dari sirkulasi ketika melewati paru-paru untuk

pertama kalinya. Pada intinya variasi ini muncul karena interaksi liposom dan sel yang dimediasi oleh reseptor, pengambilan protein pada membran liposom, dan keheterogenitasan ukuran dari populasi liposom yang tersedia.<sup>3</sup>

#### **2.2.4. Target Alami Liposom**

Liposom merupakan benda yang asing bagi tubuh sehingga, liposom akan ditangkap oleh sel-sel sistem fagositik mononuklear seperti monosit darah dan makrofag-makrofag hati, limpa, dan sumsum tulang. Fakta ini, yang dapat merupakan hal tidak diinginkan pada beberapa penyakit infeksi, merupakan keuntungan yang sangat baik pada pengobatan dengan target kerja sistem fagositik mononuklear, seperti *brucellosis*.<sup>11</sup>

Aplikasi *in vivo* saat ini dapat diterapkan dalam diagnosis, kemoterapi, kanker, terapi imun, dan terapi gen. Secara *in vivo*, walaupun terdapat variasi dalam komposisi membran, liposom hampir selalu berinteraksi secara eksklusif dengan organ-organ dari sistem retikuloendotelial (RES) seperti hepar, limpa, paru-paru, kelenjar limfe, dan sumsum tulang. Liposom dengan cepat diambil oleh sel fagosit dan didegradasi di dalam lisosom, kemudian materi-materi yang tersimpan di dalam liposom dikeluarkan ke dalam lisosom yang nantinya akan dilepaskan ke sitoplasma sel atau dieksositosis ke lingkungan eksternal sel. Perubahan distribusi obat secara *in vivo* ini menyebabkan efek toksik obat yang bersifat sistemik menjadi berkurang secara signifikan setelah pemberian secara parenteral, sementara itu konsentrasi obat yang berinteraksi dengan organ yang sakit dapat ditingkatkan beberapa kali lipat lebih tinggi daripada penggunaan obat bebas tanpa liposom.<sup>3</sup>

Liposom dapat digunakan dalam terapi penyakit intraseluler makrofag, seperti leishmaniasis, infeksi jamur, juga penyakit-penyakit yang berhubungan dengan hepar dan jaringan paru-paru. Liposom mungkin efektif terhadap tumor, baik dengan keunggulannya yang dapat berakumulasi dalam jumlah besar di organ yang terkena tumor, maupun dengan menggunakan stimulator makrofag yang disimpan dalam liposom



untuk mengaktivasi monosit agar dapat membunuh tumor. Imunomodulator yang disimpan dalam liposom dapat juga digunakan untuk stimulasi respon imun terhadap antigen yang dipresentasikan kepada makrofag *in vivo* di dalam maupun di permukaan liposom.<sup>3</sup>

#### **2.2.5. Target Spesifik Liposom**

Ketika liposom diberikan melalui intravena, liposom akan menjadi target utama sel-sel retikuloendotelial hati. Hal ini membuat liposom menjadi kurang dapat mencapai sel target.<sup>2</sup> Pemakaian determinan molekular yang diinkorporasikan di sisi luar liposom untuk meningkatkan jangkauan dan spesifitas terhadap target yang dituju telah terbukti keberhasilannya.<sup>3</sup>

Perilaku liposom dalam darah dapat dimanipulasi dengan memodifikasi karakteristik permukaannya.<sup>3</sup> Berbagai macam protein dapat disisipkan ke dalam lapisan luar liposom untuk mengubah sifat liposom secara *in vivo* termasuk kemampuan pengiriman obat yang selektif terhadap sel. Perlakuan ini dapat membuat liposom yang diberikan secara intravena menjadi terhindar dari sistem retikuloendotelial. Protein ligan atau molekul-molekul antibodi yang berada di permukaan sel dapat diinkorporasi ke dalam permukaan liposom sehingga dapat membuat liposom menjadi spesifik terhadap reseptor di permukaan sel populasi tertentu.<sup>2</sup>

#### **2.2.6. Farmakokinetik Liposom Berdasarkan Rute Pemberian**

##### **2.2.6.1. Pemberian Secara Intravena (IV)**

Pemberian liposom secara IV telah banyak diselidiki sejak tahun 1972. Liposom secara cepat dihilangkan dari sirkulasi oleh RES. Hepar mempunyai laju *clearance* (pembersihan) tercepat., diikuti oleh limpa dan sumsum tulang. Karena RES merupakan sistem pertahanan tubuh yang utama terhadap benda asing, RES dapat dengan cepat menghilangkan liposom dari sirkulasi. Menghindari fungsi pembersihan oleh RES adalah memungkinkan,

dengan merancang liposom sehingga didapatkan waktu sirkulasi yang memanjang.<sup>12</sup>

Struktur kapiler merupakan suatu sawar terhadap keluarnya liposom dari sistem sirkulasi. Dinding pembuluh kapiler dapat terbagi menjadi 3 tipe: *continous*, *fenestrated*, dan *discontinuous*. Dinding kapiler *continous* terdapat pada kapiler otot polos, jantung, dan rangka, juga pada paru-paru, kulit, jaringan subkutan, membran mukosa dan serosa. Kapiler ini mempunyai celah 20-60Å sehingga liposom terkecil pun tidak dapat menembus dinding kapiler. Dinding kapiler *fenestrated* mempunyai celah 300-800 Å. Celah ini dilapisi oleh diafragma membran yang tipis. Sedangkan dinding kapiler *discontinuous*, seperti pada hepar, memungkinkan penetrasi liposom yang berukuran kurang dari 0,2 µm. Sehingga, liposom-liposom kecil dapat mencapai hepatosit-hepatosit.<sup>12</sup>

Karena sawar dinding kapiler ini, liposom yang besar terbatas pada ruang intravaskular dan diambil oleh sel-sel fagositik seperti monosit pada darah dan makrofag-makrofag jaringan hepar, limpa, dan sumsum tulang. Ambilan terutama oleh sel-sel Kupffer hepar. Sel-sel Kupffer mempunyai kapasitas terbatas untuk memfagosit liposom. Sehingga pembersihan liposom dari sirkulasi, jenuh pada dosis yang tinggi. Setelah ambilan liposom oleh sel-sel Kupffer hepar, dapat terjadi redistribusi materi ke hepatosit-hepatosit.<sup>12</sup>

Liposom kecil akan akan dibersihkan dari sirkulasi dengan proses yang sama, dan oleh hepatosit-hepatosit. Pola pembersihan liposom dari darah dipengaruhi oleh dosis, ukuran, dan komposisi dari liposom.<sup>12</sup>

Pembersihan oleh RES terhadap liposom besar setelah pemberian IV juga dapat jenuh. Proses kejenuhan ambilan liposom meningkatkan waktu sirkulasi liposom, akan tetapi tidak menampakkan adanya peningkatan ambilan pada jaringan-jaringan lain.<sup>12</sup>

Secara umum, liposom yang lebih besar afinitasnya terhadap RES lebih besar dan pembersihannya lebih cepat. Efek peningkatan pembersihan ini diharapkan ketika RES merupakan tempat kerja obat yang terdapat dalam liposom. MLV yang besar, dibersihkan terutama oleh sel-sel Kupffer hepar (80% dosis), limpa (4,5% dosis), sumsum tulang (2% dosis). Ambilan ini terjadi sangat cepat (pada menit ke 15 hanya 9% dosis yang masih terdapat dalam darah).<sup>12</sup>

Karena ambilannya yang cepat, waktu paruh sirkulasi MLV sangatlah kecil. Setelah pemberian IV, baik MLV maupun LUV mengalami eliminasi dari sirkulasi. Eliminasi yang cepat pada awalnya dan diikuti oleh eliminasi yang lebih lambat disebabkan oleh distribusi ukuran liposom yang bervariasi. Sehingga, terdapat ambilan yang cepat pada liposom yang besar oleh RES dan diikuti dengan pembersihan yang lebih lambat pada liposom yang lebih kecil. Apabila sampel mengandung liposom yang sangat kecil, fase pembersihan yang lambat dapat disebabkan oleh ambilan hepatosit-hepatosit.<sup>11</sup>

Liposom yang besar dapat dibersihkan secara baik oleh paru melalui mekanisme penjeratan pada kapiler alveolar yang kecil. Penjeratan ini hanya bersifat sementara (beberapa jam) karena liposom dieliminasi dengan baik dengan disintegrasi atau diambil oleh fagosit dalam darah, yang kemudian menjadi makrofag alveolar.<sup>12</sup>

Komposisi liposom juga mempunyai pengaruh yang besar terhadap farmakokinetik setelah pemberian IV. Umumnya, liposom kecil dengan muatan negatif lebih cepat dibersihkan daripada liposom kecil dengan muatan positif ataupun netral. Peningkatan laju bersihan dapat disebabkan oleh interaksi muatan negatif membran liposom dengan komponen plasma.<sup>12</sup>

Liposom besar dengan muatan negatif umumnya dibersihkan dengan lebih cepat oleh limpa, sumsum tulang dan

monosit dibandingkan liposom dengan muatan positif atau netral. Laju pembersihan secara berurutan yaitu negatif > netral > positif.<sup>12</sup>

Ambilan oleh hepar paling besar pada liposom dengan muatan netral, sedangkan pada liposom dengan muatan positif dan negatif mempunyai laju yang sama akan tetapi tidak lebih cepat dari muatan netral. Terdapat bukti bahwa ambilan liposom dengan muatan negatif dan positif adalah terutama oleh paru-paru.<sup>12</sup>

Perlu diketahui bahwa liposom bisa mendapatkan muatan negatif di dalam darah disebabkan interaksi oleh komponen plasma. Muatan liposom dapat menentukan protein mana yang mengikat liposom, dan protein yang terikat ini dapat menentukan nasib liposom.<sup>12</sup>

*Plasma high-density lipoproteins* (HDL) dapat mengganggu liposom dan menyebabkan kebocoran.<sup>12</sup> Walaupun mekanismenya belum jelas, diperkirakan bahwa interaksi HDL dengan liposom menyebabkan adanya transfer lipid dari liposom ke HDL sehingga menghasilkan pori-pori dengan ukuran yang berbeda-beda yang melalui pori-pori tersebut isi liposom dapat terlepas.<sup>11</sup> Ambilan lipid dari liposom oleh HDL dapat jenuh. Kerentanan liposom terhadap kerusakan oleh HDL meningkat dengan menurunnya ukuran liposom. Lipoprotein lain tidak menampakkan adanya efek yang signifikan terhadap stabilitas liposom. Albumin mengikat liposom, akan tetapi tidak menyebabkan kerusakan.<sup>12</sup>

Inkorporasi kolesterol ke dalam liposom menguatkan susunan molekul fosfolipid dwilapis. Kolesterol mengurangi interaksi liposom dengan protein, mencakup penetrasi protein pada dwilapis, dan mengurangi kerentanan terhadap kerja fosfolipase.<sup>12</sup>

Liposom dapat menyebabkan respons antibodi, dan injeksi berulang dapat menimbulkan lisis oleh komplemen yang diinduksi oleh antibodi dan pelepasan isi liposom.<sup>12</sup>

Efek dosis dan muatan pada liposom pada farmakokinetik liposom dapat disimpulkan sebagai berikut:<sup>12</sup>

1. Waktu paruh liposom dalam darah dapat diperpanjang dengan blokade RES.
2. Ambilan liposom oleh limpa secara umum meningkat setelah blokade pada hepar.
3. Liposom besar tampak mempunyai lebih banyak bukti pada efek dosis daripada liposom kecil
4. Beberapa tempat pembersihan untuk liposom kecil tidak dapat di blokade oleh liposom besar.
5. Efek dosis liposom terhadap bersihan pada darah dan ambilan jaringan berkurang seiring dengan waktu, ambilan akan kembali pada nilai yang normal.
6. Blokade RES tidak tampak meningkatkan ambilan liposom besar oleh jaringan non-RES, walaupun distribusi relatif liposom besar pada jaringan RES mungkin berubah.
7. Liposom bermuatan seharusnya tidak digunakan untuk memblokade RES

#### **2.2.6.2. Pemberian Liposom Intraperitoneal (IP)<sup>12</sup>**

Setelah pemberian IP, liposom diabsorpsi dan memasuki sirkulasi pembuluh limfatik abdominal dengan fase absorpsi sekitar 3 sampai 4 jam. kemudian liposom terpajan pada RES. Liposom kecil dan liposom dengan muatan negatif diabsorpsi lebih cepat. Batas ukuran terbesar untuk absorpsi liposom dari rongga peritoneal belum diketahui.

Jaringan limfatik merupakan sistem tertutup yang terpisah dari ruang-ruang jaringan oleh lapisan endotel yang *intracellular junctionnya* memungkinkan masuknya bakteri, sel-sel tumor, eritrosit, limfosit, dan lain-lain. Adanya tumor menurunkan pengaliran limfatik disebabkan oleh supresi aktivitas fagositik makrofag pada nodus limfatikus.

Terdapat beberapa potensi pada penghantaran limfatik liposom melalui IP, intramuskular, atau injeksi subkutan. Sebagai contoh, memungkinkannya penghantaran suatu agen untuk menekan atau mendeteksi metastasis pada nodus limfatikus. Liposom yang kurang dari 100 nm siap ditangkap oleh limfe sedangkan yang lebih besar dari 100 nm dapat menetap pada tempat injeksi. Liposom bermuatan juga mempengaruhi lokalisasi liposom pada nodus limfatikus. Liposom dengan muatan negatif mempunyai tingkat lokalisasi yang paling tinggi, yang kemudian diikuti oleh muatan positif pada tingkat selanjutnya, dan yang paling rendah adalah liposom netral.

#### **2.2.6.3. Injeksi Lokal<sup>12</sup>**

Pemberian liposom secara lokal digunakan untuk membatasi kerja obat pada tempat tertentu, karena liposom itu besar dan cenderung menetap pada tempat injeksi. Liposom yang menetap pada tempat injeksi memaksimalkan konsentrasi obat lokal sehingga meminimalisir kadar obat sistemik dan juga dapat memperpanjang lama kerja.

Setelah injeksi subkutan, kebanyakan liposom menetap pada tempat injeksi. Setiap liposom yang meninggalkan tempat tersebut diabsorpsi ke dalam sirkulasi melalui sistem limfatik dan terkadang dibersihkan oleh RES. Liposom dapat menjadi bocor dalam perjalanan melalui limfatik. ini akan berguna apabila nodus limfatikus merupakan target obatnya. Ambilan liposom oleh nodus limfatikus regional lebih baik pada liposom yang kecil.

#### **2.2.6.4. Liposom dengan Waktu Sirkulasi yang Diperpanjang<sup>12</sup>**

Terdapat kebutuhan terhadap liposom dengan waktu sirkulasi yang diperpanjang untuk meningkatkan kemungkinan tercapainya pada tempat target diluar pembuluh. Juga, perpanjangan sirkulasi dapat memungkinkan penggunaan liposom sebagai mikroreservoir untuk obat dengan pelepasan lambat. Akhirnya, sirkulasi yang diperpanjang dapat mencegah lokalisasi

liposom pada RES, dan kerusakan oleh sistem pertahanan tubuh ini.

Beberapa strategi untuk meningkatkan waktu sirkulasi liposom telah berhasil dilakukan, mencakup inklusi kolesterol, fosfolipid *high-phase-transition-temperature* pada formulasi, penambahan gangliosida GM1, atau derivat lipid sintetik polietilen glikol. Semua strategi ini tampak bekerja dengan menurunkan interaksi protein dengan liposom.

### 2.3. Tetraeter Lipid

Tetraeter Lipid (TEL) merupakan salah satu produk hasil ekstraksi dari Archaea yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum* atau *Sulfolobus acidocaldarius*. Tetraeter lipid dari *Thermoplasma acidophilum* telah teruji tidak toksik dan tidak bersifat mutagenik atau antimutagenik, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*.<sup>6</sup>

Satu karakteristik yang membedakan archaea dari sel-sel lain adalah *phytanol ether lipids*. Pada membran archaea, ditemukan berbagai tipe dieter dan tetraeter lipid, *Thermoplasma acidophilum* merupakan *thermoacidophilic archaeon*, yang pertama kali diisolasi oleh Darland et al. *Archaeon* ini tidak mempunyai dinding sel, membran sitoplasmanya sangat resisten terhadap pH asam. Pada laboratorium, *Thermoplasma acidophilum* tumbuh maksimum pada pH 2 dan suhu 59°C pada *sulfuric acid-containing Freund's medium*.<sup>13</sup>

Lipid yang menyusun membran archaea berbeda dengan fosfolipid bilayer yang terdapat pada semua sel lain. Perbedaan struktural ini telah digunakan untuk mengkarakteristikan sel-sel archaea dan untuk membedakan mereka dari bakteri atau eubakteri dan eukariot.<sup>13</sup>

Lipid archaea merupakan eter gliserol (atau poliol lainnya, seperti nonitol pada spesies *Sulfolobus*) dimana hanya fosfat, apabila ada, yang berikatan dengan ikatan ester. Selain itu, lipid-lipid archaea tidak mengandung ikatan ganda tetapi mengandung gugus samping metil, dan mereka juga membentuk pentasiklik pada ikatan hidrokarbon karena peningkatan temperatur.<sup>13</sup>

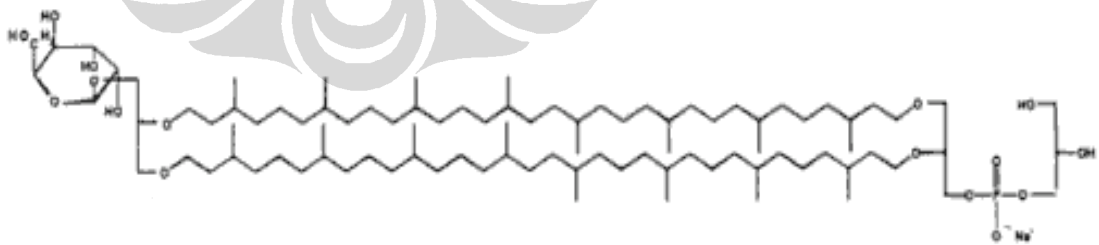
Tidak adanya ikatan ganda meningkatkan resistensi lipid terhadap oksidasi dan adanya gugus samping metil menampakkan *fluidizing effect*. Ikatan eter

mempunyai keuntungan dibandingkan ester pada lingkungan asam karena mereka resisten terhadap hidrolisis pada pH rendah dan pada suhu yang tinggi.<sup>13</sup> Sehingga, liposom yang dibuat dari tetraeter lipid archaea lebih *thermostable*. Selain itu, berbeda dengan ikatan ester, ikatan eter tidak rentan terhadap degradasi enzimatik oleh fosfolipase.<sup>14</sup>

Selain struktur dieter, tetraeter lipid ditemukan pada beberapa genera archaea. Pada tetraeter lipid residu *phytanyl* secara kovalen terikat pada terminal (omega) karbon untuk membentuk *dibiphytanyl tetraether macrocycle* dengan 72 atom yang berpartisipasi pada *cycle*.<sup>13</sup>

Lipid membran dari *Thermoplasma acidophilum* mengandung *tetraether macrocycle* ini. Berdasarkan pengamatan Langworthy, pada kedua rantai *biphytanyl* terjadi pentasiklisasi simetris. Dengan sampai 2 *pentacycle* per rantai dan sejalan dengan meningkatnya temperatur tumbuh dari 39°C menjadi 59° C. Ditemukan suatu pola yang berbeda pada pentasiklisasi yang menunjukkan sejumlah *pentacycle* yang berbeda pada 2 rantai hidrokarbon. Karena derajat pentasiklisasi dan tingkat distorsi rantai-rantai hidrokarbon, jarak antara 2 molekul gliserol adalah 3-4 nm, berhubungan dengan regio hidrofobik. Sehingga, dimensi TEL cukup dengan bentuk monolayer dengan ketebalan sama dengan membran dwilapis yang umum.<sup>13</sup>

Formulasi kimia TEL dari *Thermoplasma acidophilum* telah diberikan oleh Strobl et al. Sebagai *2,3,2',3'-tetra-O-dibiphytanyldi-sn-glycerol-1'-glycosyl-1-phosphoryl-3'-sn-glycerol*.<sup>13</sup>



Gambar 2. Tetraeter lipid utama pada *Thermoplasma acidophilum*<sup>13</sup>

TEL dapat membentuk fase campuran dengan lipid yang membentuk struktur dwilapis. Sehingga, memungkinkan untuk dibuat suatu campuran liposom yang stabil menggunakan fosfatidil kolin dan tetraeter lipid.<sup>13</sup>



Ukuran liposom TEL bergantung pada metode preparasinya. Ukuran mengecil dengan urutan sebagai berikut *hand-shaken* > *sonicated* > *detergent dialyzed* > *filter extruded* > *French cell extruded*. Ukuran pada liposom *hand-shaken* sekitar beberapa mikrometer dengan distribusi ukuran yang sangat luas. Liposom ini multilamellar dan polimorf, sedangkan liposom TEL yang lebih kecil cenderung menjadi unilamellar dan bulat. Liposom TEL *sonicated* adalah sekitar 450-600 nm, sedangkan liposom *detergent-dialyzed* 370-450 nm. Disamping metode preparasi, tingkat kemurnian TEL juga penting. Ukuran partikel mengecil seiring dengan peningkatan kemurnian TEL.<sup>13</sup>

Tabel 1. Ukuran liposom TEL berdasarkan metode preparasi<sup>13</sup>

Method of preparation	Size, average mean (SD)
1. Hand-shaken	7500 nm (2500->20,000)
2. Sonication	600 nm ( $\pm 40$ )
3. Detergent dialysis	370 nm ( $\pm 35$ )
4. Filter extrusion	220 nm ( $\pm 60$ )
5. French press	150 nm ( $\pm 22$ )

Degradasi TEL belum terklarifikasi. Ambilan pada hepatosit tampaknya ada, akan tetapi produk degradasi tidak dapat dengan mudah terlihat karena sedikitnya jumlah, dan identifikasinya menjadi lebih sulit karena substansi yang menjadi rujukan produk degradasi TEL belum tersedia.<sup>13</sup>

Tetraeter lipid dari *Thermophilus acidophilum* membentuk liposom yang sangat stabil sampai dengan ukuran 100 nm. Tetraeter lipid bercampur dengan EPC dan menstabilkan liposom fosfatidil kolin. TEL memberikan muatan negatif terhadap liposom fosfatidil kolin dan juga secara kovalen menghubungkan kedua permukaan polar pada membran dwilapis liposom. Sehingga, TEL merupakan penstabil struktural dan elektrostatis pada dwilapis fosfatidil kolin.<sup>13</sup>

Terlepas dari resistensi terhadap suhu, hidrolisis, dan serangan oksidatif, membran TEL sangat stabil terhadap pengaruh mekanis. Lebih dari itu, pada *freeze-fracture electron microscopy*, membran ini tidak rusak pada bidang membran (*tangentially*, seperti yang terjadi pada dwilapis) akan tetapi tegak lurus terhadap bidang membran.<sup>13</sup>

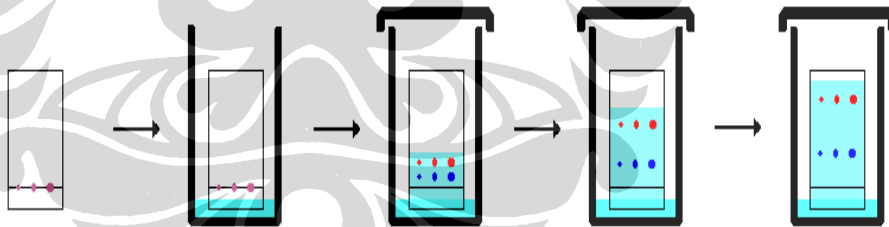
Stabilitas liposom TEL meningkat pada pH yang rendah dari pada pH netral atau alkali. Sehingga liposom TEL dapat berguna untuk membawa obat

yang labil terhadap keasaman lambung. Akan tetapi dalam garam empedu konsentrasi tinggi pada pH alkali stabilitas TEL pada pH asam berkurang dan terjadi pelepasan komponen yang terdapat dalam liposom.<sup>13</sup>

Hasil penelitian sementara menunjukkan liposom TEL mempunyai interaksi yang sama dengan membran sel seperti liposom lainnya seperti pertukaran intermembran, fenomena fusi, dan endositosis.<sup>13</sup>

#### 2.4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi merupakan metode separasi dimana substrat-substrat terdistribusi antara fase diam dan fase gerak. Separasi terjadi karena substrat-substrat mempunyai afinitas yang berbeda terhadap fase diam dan fase gerak, sehingga akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda.<sup>15</sup> Kromatografi lapis tipis adalah salah satu model kromatografi yang menggunakan fase diam hidrofilik berupa, antara lain, gel silika, selulosa yang dilekatkan pada matriks yang cocok dan dilapiskan secara tipis pada permukaan piring plastik atau gelas. Fase gerak dapat bergerak secara horizontal atau vertikal berdasarkan sistem kapilaritas.<sup>3</sup>



Gambar 3. Skema kromatografi lapis tipis. Suatu campuran komponen pada akhirnya akan terpisah menjadi komponen-komponennya masing-masing.<sup>16</sup>

Fase diam silika, merupakan material polar dapat membentuk ikatan hidrogen dengan beberapa komponen seperti alkohol, amin, dan asam karboksilat. Komponen-komponen ini cenderung 'menempel' pada silika. Sedangkan komponen yang lain, yang kurang polar, tidak akan berinteraksi dengan silika dan akan bergerak lebih cepat.<sup>15</sup>

Fase gerak merupakan faktor lain yang termasuk dalam separasi pada kromatografi. Karena komponen polar 'menempel' lebih kuat pada silika, maka dibutuhkan fase gerak yang lebih polar untuk mengalahkan interaksi ini dan menggerakkan komponen-komponen melalui lempeng silika. Komponen-komponen yang kurang polar tidak terlalu kuat berinteraksi dengan silika dan dengan mudah terlepas menggunakan fase gerak apapun. Fase gerak juga mempunyai afinitas terhadap fase diam, dan dapat menggeser zat terlarut.<sup>15</sup>

Pada prakteknya pilihan fase gerak yang tepat biasanya membutuhkan beberapa percobaan, juga pengetahuan umum mengenai kelompok fungsional polar dan non-polar. Pilihan fase gerak yang tepat akan memberikan nilai  $R_f$  yang berbeda pada semua komponen yang dipisahkan. Untuk separasi yang baik pada campuran komponen-komponen, fase gerak seharusnya cukup polar sehingga semua komponen bergerak dari posisi awalnya, akan tetapi tidak sangat polar, karena fase gerak yang terlalu polar akan menyebabkan semua komponen bergerak dengan fase geraknya di muka. Terkadang campuran dari 2-3 fase gerak diperlukan untuk menghasilkan keseimbangan seperti ini.<sup>15</sup>

Kromatografi lapis tipis menjadi sangat penting dalam menganalisis steroid karena dapat memisahkan secara jelas bahan-bahan yang belum diketahui dengan konsentrasi 0,01 – 100  $\mu\text{g}$  dalam waktu sangat cepat.<sup>6</sup> Solut pada fase gerak akan memiliki afinitas yang berbeda terhadap fase diam. Seiring dengan berjalannya fase gerak melalui fase diam, lipid yang berbeda akan menyebar dan menetap di daerah yang berbeda pada fase diam.<sup>3</sup>

Pada fosfolipid, fase diam yang paling umum digunakan adalah silika, yang cukup higroskopik, dan terdiri atas granula-granula yang pada kondisi normal permukaannya dilapisi dengan selapis yang berikatan kuat dengan air. Fase gerak biasanya campuran dari berbagai fase gerak (*solvent*) termasuk kloroform.<sup>3</sup>

Lipid dapat divisualisasikan menggunakan pewarnaan spesifik yang disebarkan pada permukaan lempeng atau melalui metode non-spesifik dengan pemberian yodium. Jika lipid dapat menyerap sinar ultraviolet (UV), maka visualisasinya dilakukan pada fase diam yang mengandung materi fluoresen tanpa pewarnaan. Dengan demikian ketika diiluminasi dengan sinar UV bercak akan terlihat gelap pada latar yang terang. Identifikasi lipid yang berbeda didasarkan

pada kecepatan gerak masing-masing lipid (diekspresikan dengan nilai *Rf*), dan dibandingkan dengan kontrol yang dijalankan pada lempeng yang sama.<sup>3</sup>

Kromatografi lapis tipis juga dapat memberi informasi mengenai kemurnian dan konsentrasi lipid. Lipid murni akan meninggalkan bercak tunggal pada fase diam. Fosfolipid yang telah mengalami degradasi, akan terlihat banyak bercak dengan *Rf* yang berbeda-beda dibandingkan dengan fosfolipid yang belum mengalami degradasi yang akan terlihat sebagai bercak tunggal yang sangat jelas.<sup>3</sup>

## 2.5. Mencit C3H

Mencit C3H yang dibudidayakan sejak tahun 1960 oleh Bagian Patologi Anatomik FKUI telah menghasilkan breeding ratusan kali, umumnya digunakan pada penelitian tumor atau kanker.<sup>8</sup> Mencit C3H merupakan mencit hasil perkawinan silang, yang dipelopori oleh L. C. Strong, yaitu antara mencit Bagg albino betina dengan mencit DBA jantan.<sup>17</sup>

Respons imunologik pada mencit secara umum sangat dipengaruhi oleh sifat fisik dan kimia antigen termasuk bentuk sediaan (larutan atau suspensi) yang akan dipaparkan, cara pemberian, umur, intensitas, dan lama imunisasi serta faktor genetik. Beberapa penelitian tentang respon imun yang menggunakan mencit C3H sebagai hewan coba, antara lain untuk menguji aktivitas *bcl-2* dalam menghambat berbagai bentuk apoptosis timosit yang bukan disebabkan karena hasil seleksi negatif dan pada uji karakterisasi sel sitotoksik yang berinfiltrasi ke lokasi transplantasi dengan menggunakan bahan spons. Dalam keadaan normal, dengan pemberian makanan standar dan vitamin serta minum secukupnya, mencit berumur 12-16 minggu mempunyai berat badan sekitar 18-24 g. Pada pemeriksaan darah rutin, kadar hemoglobin rata-rata adalah 12,2 g% dan hitung leukosit rata-rata adalah 7300 sel/mL. Berat organ limfoid rata-rata adalah sebagai berikut: timus 27 mg, limpa 150 mg, sedangkan organ lain semisal hepar seberat 900 mg dan ginjal sekitar 120 mg.<sup>8</sup>

Pada mencit, rute pemberian obat yang paling umum dilakukan adalah intraperitoneal. Hal ini disebabkan oleh tekniknya yang sederhana dan mudah, dibandingkan dengan pemberian melalui intravena yang memerlukan teknik dan

keterampilan yang tinggi. Laju absorpsi substrat melalui rute ini adalah  $\frac{1}{2}$  -  $\frac{1}{4}$  kali kecepatan pada intravena.<sup>17</sup>

Prosedur euthanasia menurut *Animal Experimentation Ethics Committee* (AEEC) pada tahun 2004 adalah wadah yang digunakan untuk euthanasia harus terbuat dari bahan yang transparan dan kuat agar dapat menahan uap eter dan pergerakan dari mencit. Mulut wadah harus cukup lebar sehingga memungkinkan mencit untuk melaluinya dan memudahkan pengangkatan mencit yang sudah mati, juga mempermudah dalam membersihkannya. Tutup wadah harus kedap udara. Mencit diletakkan ke dalam wadah, umumnya dialasi dengan kapas atau tisu, agar dapat dengan mudah dibasahi dengan eter. Jumlah hewan per wadah dianjurkan secukupnya sehingga tidak saling melukai sebelum mati.<sup>8,18</sup>

## 2.6. Kerangka Konsep

