

## **BAB III**

### **METODOLOGI**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental untuk menguji stabilitas fisik formulasi terbaru liposom EPC-TEL 2,5 hasil ekstrusi sebagai pembawa obat pada suhu 4°C dan 37°C.

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

Lama penelitian mulai dari pembuatan proposal hingga penyusunan laporan adalah kurang lebih dua tahun tiga bulan. Penelitian ini dilaksanakan secara bertahap dan berkesinambungan:

- a. Pembuatan liposom : 16 Februari 2007
- b. Tahap I : 8 Mei 2007 (hari pertama)
- c. Tahap II : 14 Mei 2007 (hari ketujuh)
- d. Tahap III : 4 Juni 2007 (akhir bulan pertama atau hari ke-28)
- e. Tahap IV : 2 Juli 2007 (akhir bulan kedua atau hari ke-56)
- f. Tahap V : 30 Juli 2007 (akhir bulan ketiga atau hari ke-84)

Penelitian ini dilaksanakan di tiga tempat, yaitu: Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran FKUI, Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI, dan Departemen Fisika Kedokteran FKUI; jalan Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat 10430.

#### **3.3 Besar Sampel**

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus Federer:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan:

n= jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t= jumlah kelompok perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan sepuluh kelompok perlakuan yaitu liposom ekstrusi yang disimpan pada suhu 4°C yang diamati pada hari pertama, ke-7, bulan ke-1, bulan ke-2, bulan ke-3, serta liposom ekstrusi yang disimpan pada suhu 37°C yang diamati pada hari pertama, ke-7, akhir bulan ke-1, bulan ke-2, dan bulan ke-3.

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(10-1) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 15/9$$

$$(n-1) \geq 1,67$$

$$n \geq 2,67 \text{ (dibulatkan menjadi 3)}$$

Dengan demikian, dibutuhkan minimal tiga buah sampel dalam setiap kali pengamatan. Peneliti memutuskan mengambil lima buah sampel dalam setiap kali pengamatan agar lebih akurat.

### 3.4 Bahan dan Alat

1. Bahan dan reagen habis pakai : fosfatidilkolin dari kuning telur (EPC) Lipoid® dan tetra eter lipid (TEL) dari *Thermoplasma acidophilum* yang diperoleh dari IFB-Jerman, kloroform, etanol 98 %, aquabidestilasi, dan *quinacrine* 0,005 % sebagai pewarna liposom.
2. Alat-alat: *rotavapor-vacuum pump waterbath Büchi*, sentrifus, gelas objek berskala Olympus, ekstruder, *filter* 200 nm, timbangan analitik, mikroskop yang disambungkan ke kamera Sony CCD-IRIS *color video camera*.

### 3.5 Cara Kerja

1. Pembuatan Liposom

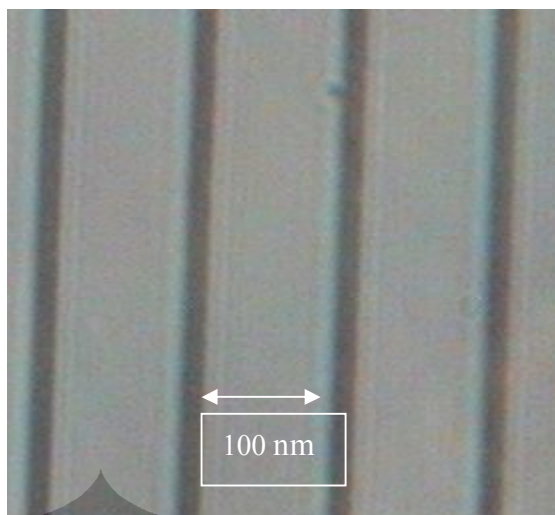
Semua alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dengan etanol 70 %, kemudian dengan akuabides dan dicuci lagi dengan etanol. EPC dan TEL ditimbang sesuai dengan perhitungan yang terdapat pada lampiran dan dimasukkan ke dalam labu waterbath Büchi. Dalam tabung yang lain dibuat campuran 20 ml etanol 98 % dan 20 ml kloroform. Sebanyak 1 ml campuran tersebut diambil untuk melarutkan EPC dan TEL, kemudian sisanya dituangkan

ke dalam labu atau *round bottom glass*. Labu dipasang pada tempatnya, *waterbath* Büchi diisi dengan air sampai seperempat bagian labu terendam dan dipanaskan dengan suhu 40°C. Tombol pemutar, mesin vakum, dinyalakan dan tekanannya diatur sehingga turun perlahan mencapai 200 milibar. Bila larutan di dalam labu sudah mengalami evaporasi dan terbentuk lapisan putih, tekanan diturunkan perlahan hingga mencapai tekanan di bawah 50 milibar. Proses pemutaran dihentikan apabila aroma campuran kloroform dan etanol dari labu tidak tercium lagi. *Round bottom glass* yang berisi liposom yang berbentuk lapisan putih tipis kemudian disimpan di lemari es sementara menunggu hari dilakukannya pengamatan pertama. Pada pengamatan hari pertama, lapisan putih liposom kemudian dilarutkan dengan akubides sebanyak 50 ml. Selanjutnya larutan *quinacrine* 0,005 % ditambahkan ke dalam larutan liposom.

Liposom EPC-TEL 2,5 yang sudah ditambah dengan larutan *quinacrine* kemudian diekstrusi dengan ekstruder 200 nm. Liposom hasil ekstrusi kemudian dibagi lagi ke dalam 2 botol lainnya untuk disimpan pada dua suhu yang berbeda yaitu suhu 4°C dan suhu 37°C. Lama penyimpanan dalam penelitian ini ditetapkan selama tiga bulan (kurang lebih 84 hari), jangka waktu yang dirasa cukup efektif untuk penyimpanan sediaan liposom.

## 2. Perlakuan Terhadap Liposom (pada hari ke-1 dan seterusnya)

Liposom ditetaskan sebanyak 25 mikroliter pada kaca objek berskala, kemudian ditutup dengan kaca penutup dan diamati dengan *image processing unit* yang terdiri dari mikroskop, *CCD camera* dan komputer dengan pembesaran 10x40 kali. Dalam pengamatan diambil gambar sebanyak sepuluh lapang pandang tiap kelompok perlakuan dan satu buah video berdurasi 15 detik. Liposom dibedakan dari partikel *quinacrine* berdasarkan karakteristik partikel liposom memiliki halo dan gerak Brown. Kemudian, jumlah dan diameter liposom dihitung persepuluh lapang pandang. Diameter liposom diukur berdasarkan skala pada kaca objek Olympus.



Gambar 2: Foto skala Olympus dengan jarak antara dua garis 100 nm

### 3.6 Identifikasi Variabel

Variabel bebas : Suhu, perlakuan ekstrusi 200 nm dan waktu penyimpanan

Variabel terikat : Jumlah dan diameter partikel liposom

### 3.7 Rencana Manajemen dan Analisis Data

Kestabilan liposom ditentukan dengan membandingkan jumlah dan diameter liposom dengan variabel  $d \leq 100$  nm dan  $d > 100$  nm pada hari pertama, hari ke-7, hari ke-28 (bulan ke-1), hari ke-56 (bulan ke-2), dan hari ke-84 (bulan ke-3). Perbedaan jumlah yang signifikan dan bermakna menunjukkan liposom tidak stabil.

Gambar liposom yang telah diperoleh dengan kamera dan mikroskop dihitung dan dijumlahkan persepuluh lapang pandang tiap perlakuan. Perhitungan tersebut dilakukan sebanyak lima kali sesuai dengan hasil yang diperoleh dari perhitungan dengan rumus Federer.

Dengan demikian skala pengukuran merupakan skala ordinal dan terdapat lebih dari dua kelompok. Data yang telah diperoleh dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis menggunakan program komputer SPSS 11,5.

### 3.8 Definisi Operasional

1. Tetra eter lipid (TEL) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan TEL

yang diekstraksi dari bakteri *Th. acidophilum*.

2. EPC-TEL 2,5 adalah suatu liposom yang merupakan kombinasi *egg yolk phosphatidilcholine* dengan TEL yang konsentrasinya 2,5 mol % dari konsentrasi EPC.
3. Uji stabilitas fisik yang dimaksud dalam proposal ini adalah mengukur jumlah dan ukuran partikel liposom (*in vitro*) persatuan waktu.

