



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH ENKAPSULASI LIPOSOM TERHADAP
AKTIVITAS ANTIBAKTERI GENTAMISIN SULFAT**

SKRIPSI

**ELPHINA ROLANDA
0806327780**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH ENKAPSULASI LIPOSOM TERHADAP
AKTIVITAS ANTIBAKTERI GENTAMISIN SULFAT**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi

**ELPHINA ROLANDA
0806327780**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 9 Juli 2012



Elphina Rolanda

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Elphina Rolanda

NPM : 0806327780

Tanda Tangan : 

Tanggal : 9 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Elphina Rolanda
NPM : 0806327780
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Pengaruh Enkapsulasi Liposom terhadap Aktivitas Antibakteri Gentamisin Sulfat

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Iskandarsyah, M.S., Apt. (.....)
Pembimbing II : Prof. Dr. Atiek Soemiati, M.S. (.....)
Penguji I : Prof. Maksum Radji, M.Biomed., Ph.D., Apt. (.....) *Maksum Radji*
Penguji II : Nelly D. Leswara, M.Sc., Ph.D., Apt. (.....) *Nelly D. Leswara*

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 3 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak sejak masa perkuliahan hingga masa penyusunan skripsi, sulit untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan terima kasih dan rasa hormat kepada:

1. Dr. Iskandarsyah, M.S., Apt sebagai dosen pembimbing I dan Prof. Dr. Atiek Soemiati, M.S., Apt. sebagai dosen pembimbing II penulis yang telah menyediakan waktu dan pikiran untuk membantu dan mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
2. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S. selaku Kepala Departemen FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini;
3. Prof. Maksum Radji, M.Biomed., Ph.D., Apt selaku pembimbing akademik yang telah memberikan banyak perhatian, saran, dan bantuan selama ini;
4. Seluruh Bapak dan Ibu dosen Departemen Farmasi FMIPA UI atas segala ilmu pengetahuan dan didikannya selama ini;
5. Mas Tri, Mbak Catur, Mbak Defvanny, Pak Imih, Pak Ma'ruf, dan Pak Surata serta seluruh karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI atas bantuan dan perhatian yang diberikan selama penelitian berlangsung;
6. Papa, Mama, adik Gopas, dan keluarga tercinta yang telah memberi bantuan dukungan baik moril maupun materil selama ini;
7. Ibu Linda, PT. Pratapa Nirmala dan Ibu Lina, Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia atas bantuan penyediaan bahan penelitian;
10. Bapak Azwar, Departemen Fisika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia dan Departemen Metalurgi, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia atas bantuan pemeriksaan sampel;

11. Leonardus Kelvin Handaya, sahabat-sahabat tercinta D'Pandewes (Indah, Reza, Ali, Yogo, Ryan, Setiawan, Irfan, Delly), Kak Ken, teman-teman KBI farmasetika dan mikrobiologi, serta rekan-rekan farmasi 2008 lainnya, atas kebersamaan, dukungan, dan persaudaraan yang indah selama ini;
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan dukungan dan bantuannya selama penelitian dan penulisan skripsi ini berjalan.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis dengan senang hati menerima segala kritik dan saran demi perbaikan di masa yang akan datang. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan ilmu farmasi pada khususnya.

Penulis
2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Elphina Rolanda
NPM : 0806327780
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Pengaruh Enkapsulasi Liposom terhadap Aktivitas Antibakteri Gentamisin Sulfat

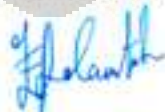
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada Tanggal : 9 Juli 2012

Yang menyatakan



(Elphina Rolanda)

ABSTRAK

Nama : Elphina Rolanda
Program Studi : Farmasi
Judul : Pengaruh Enkapsulasi Liposom terhadap Aktivitas Antibakteri
Gentamisin Sulfat

Penggunaan antibiotik dalam masyarakat sangat tinggi. Sampai saat ini, masih terdapat berbagai masalah yang ditimbulkan oleh penggunaan antibiotik. Gentamisin sulfat, antibiotik aminoglikosida dengan profil bioavailabilitas buruk dan efek samping, memerlukan jalan keluar untuk menjadikan antibiotik ini memiliki aktivitas lebih baik lagi dan aman. Liposom, sebagai karier pengantaran obat telah terbukti sukses meningkatkan aktivitas antibakteri banyak senyawa obat dari berbagai kelas antibiotik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi hambat minimum (KHM) larutan gentamisin sulfat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 15,63 ppm dan terhadap *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* adalah 62,5 ppm. Konsentrasi bunuh minimum (KBM) larutan gentamisin sulfat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 15,63 ppm dan terhadap *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* adalah 62,5 ppm sedangkan konsentrasi bunuh minimum suspensi liposom gentamisin sulfat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 7,81 ppm dan terhadap *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* adalah 3,91 ppm. Dengan demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa enkapsulasi liposom meningkatkan aktivitas antibakteri gentamisin sulfat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*.

Kata Kunci : antibakteri, gentamisin sulfat, liposom, *Pseudomonas aeruginosa*

xvi+92 halaman; 36 gambar, 11 tabel, 9 lampiran

Bibliografi : 36 (1962-2011)

ABSTRACT

Name : Elphina Rolanda
Program Study: Pharmacy
Title : The Effect of Liposome Encapsulation on Antibacterial Activity of Gentamicin Sulfate

The use of antibiotic in society is very high. Until this moment, there are various problem caused by the use of antibiotics. Gentamicin sulfate, an aminoglycoside antibiotic which has poor bioavailability and side effect, requiring a way out to make its activity better and more safe. Liposome, as a carrier for drug delivery system, have been successfully improve the activity of many antibacterial compound from different classes of antibiotics. The result of this research shown that the the minimum inhibitory concentration (MIC) for gentamicin sulfate solution againsts *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 is 15.63 ppm and 62.5 ppm when againsts *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*. Minimum bactericidal concentration (MBC) for gentamicin sulfate solution againsts *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 is 15.63 ppm and when againsts *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* is 62.5 ppm while the minimum bactericidal concentration for gentamicin sulfate liposomal suspension againsts *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 is 7.81 ppm and when againsts *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* is 3.91 ppm. Thus, the conclusion that can be drawn is liposome encapsulation improved gentamicin sulfate's antibacterial activity againsts *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords : antibacterial, gentamicin sulfate, liposome, *Pseudomonas aeruginosa*

xvi+92 pages; 36 pictures, 11 tables, 9 appendixes
Bibliography : 36 (1962-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah dan Ruang Lingkup	4
1.3. Jenis Penelitian dan Metode yang Digunakan	4
1.4. Hipotesis	4
1.5. Tujuan Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Liposom	5
2.2. Fosfolipid	7
2.3. Kolesterol	8
2.4. Antibakteri	9
2.5. Gentamisin Sulfat	11
2.6. Evaluasi Liposom	13
2.6.1. Morfologi (Bentuk Fisik)	13
2.6.2. Distribusi Ukuran Partikel	13
2.6.3. Daya Jerap Obat	14
2.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.8. <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.9. Uji Aktivitas Antibakteri	16
BAB 3 METODE PENELITIAN	19
3.1. Lokasi	19
3.2. Alat	19
3.3. Bahan	19
3.4. Metode Pelaksanaan.....	20
3.4.1. Pembuatan Liposom	20
3.4.2. Pembuatan Larutan Stok Gentamisin Sulfat	20
3.4.3. Evaluasi Liposom	21
3.4.3.1. Morfologi Liposom	21
3.4.3.2. Pengukuran Distribusi Ukuran Partikel	21

3.4.3.3.	Penentuan Efisiensi Penjerapan Liposom	21
a.	Pemurnian Suspensi Liposom.....	21
b.	Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Stok Gentamisin Sulfat dan Uji Mikrobiologi <i>Supernatant</i> dengan Metode Cakram	21
c.	Perhitungan Efisiensi Penjerapan Liposom	23
3.4.4.	Pembuatan Media Tioglikolat Cair	23
3.4.5.	Uji Sterilitas	24
3.4.6.	Suspensi McFarland III	25
3.4.7.	Pembuatan Media Agar Nutrisi	25
3.4.8.	Pembuatan Media Agar Mueller-Hinton	26
3.4.9.	Pembuatan Agar Cetrimide	26
3.4.10.	Pembuatan Biakan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 dan <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	26
3.4.10.1.	Pembuatan Daerah Kerja Aseptis	26
3.4.10.2.	Pembuatan Agar Miring	26
3.4.10.3.	Teknik Inokulasi pada Agar Miring	27
3.4.11.	Identifikasi Bakteri	28
3.4.12.	Pembuatan Media Kaldu Mueller-Hinton	29
3.4.13.	Uji Aktivitas Antibakteri	29
3.4.13.1.	Pembuatan Inokulum Bakteri	29
3.4.13.2.	Pembuatan Larutan Uji	29
3.4.13.3.	Penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) terhadap Bakteri	29
BAB 4	HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1.	Pembuatan Liposom.....	31
4.2.	Evaluasi Liposom.....	32
4.2.1.	Morfologi Liposom.....	32
4.2.2.	Pengukuran Distribusi Ukuran Partikel	33
4.2.3.	Penentuan Efisiensi Penjerapan Liposom.....	34
4.3.	Uji Sterilitas	38
4.4.	Identifikasi Bakteri.....	39
4.5.	Uji Aktivitas Antibakteri.....	41
BAB 5	KESIMPULAN DAN SARAN	47
5.1.	Kesimpulan	47
5.2.	Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Struktur Bangun Kolesterol.....	8
2.2. Struktur Bangun Gentamisin Sulfat	11
3.1. Alat yang digunakan : (a) <i>Vacuum Rotary Evaporator</i> , (b) <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM), (c) Alat <i>Coating</i> , (d) Alat Pewarnaan Gram, (e) <i>Bio Safety Cabinet</i> (BSC), (f) Inkubator Suhu 37°C.....	51
3.2. Gambar alat yang dipakai: (a) pH Meter, (b) Hot Plate dan Stirrer, (c) Oven Pengering, (d) Oven Pengering, (e) Timbangan Analitik, (f) Mikroskop Optik, (g) Vortex	52
3.3. Gambar alat yang dipakai: (a) Lemari Pendingin dan (b) Autoklaf.....	53
4.1. Gambar suspensi (a) Suspensi Liposom Kosong dan (b) Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat	53
4.2. Hasil Pemeriksaan <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM) Suspensi Liposom Kosong.....	54
4.3. Hasil Pemeriksaan <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM) Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat	54
4.4. Hasil Uji Sterilitas	55
4.5. Hasil Uji I Penentuan Efisiensi Penjerapan dengan Metode Cakram	56
4.6. Hasil Uji II Penentuan Efisiensi Penjerapan dengan Metode Cakram.....	56
4.7. Grafik Hubungan Konsentrasi Gentamisin dengan Zona Hambat pada Hasil Uji Penetapan I Efisiensi Penjerapan Liposom dengan Metode Cakram.....	57
4.8. Grafik Hubungan Konsentrasi Gentamisin dengan Zona Hambat pada Hasil Uji Penetapan II Efisiensi Penjerapan Liposom dengan Metode Cakram.....	57
4.9. Pengamatan Mikroskopik Pewarnaan Gram (a) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (b) <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	58
4.10. Warna Koloni pada Agar Cetrimide (a) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (b) <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	58
4.11. Hasil Uji Resistensi (a) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (b) <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i> dengan blanko cakram kosong (kiri) dan cakram larutan standar gentamisin sulfat (kanan).....	58
4.12. Hasil Uji KHM I Larutan Standar Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	59
4.13. Hasil Uji KHM II Larutan Standar Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	60
4.14. Hasil Uji KHM I Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	61
4.15. Hasil Uji KHM II Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	62
4.16. Hasil Uji KHM I Larutan Standar Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	63
4.17. Hasil Uji KHM II Larutan Standar Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	64
4.18. Hasil Uji KHM I Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	65

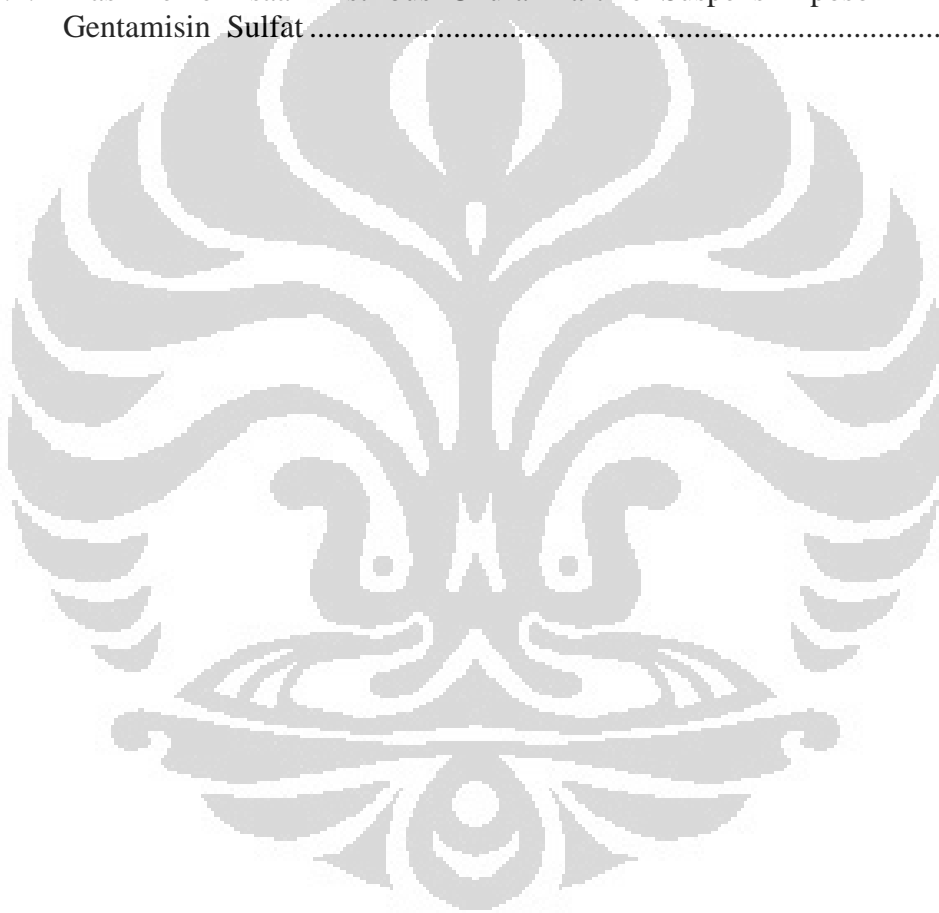
4.19. Hasil Uji KHM II Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	66
4.20. Kontrol Positif Uji KHM	67
4.21. Kontrol Negatif Uji KHM.....	67
4.22. Hasil Uji KBM I Larutan Standar Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	68
4.23. Hasil Uji KBM II Larutan Standar Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	69
4.24. Hasil Uji KBM I Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	70
4.25. Hasil Uji KBM II Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	71
4.26. Hasil Uji KBM I Larutan Standar Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	72
4.27. Hasil Uji KBM II Larutan Standar Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	73
4.28. Hasil Uji KBM I Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	74
4.29. Hasil Uji KBM II Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	75
4.30. Kontrol Positif Uji KBM.....	76
4.31. Kontrol Positif Uji KBM.....	76
4.32. Uji KBM Kontrol Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat (Kontrol Negatif)	77
4.33. Grafik Perbandingan KBM Berdasarkan Strain Bakteri terhadap Larutan Gentamisin Sulfat dan Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat	77
4.34. Grafik Perbandingan KHM Berdasarkan Strain Bakteri terhadap Larutan Gentamisin Sulfat	77

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1. Formulasi Liposom.....	20
3.2. Komposisi larutan McFarland III	25
4.1. Hasil Uji Sterilitas	78
4.2. Hasil Penetapan Efisiensi Penjerapan Liposom dengan Metode Uji Cakram.....	78
4.3. Hasil Uji KHM Larutan Standar Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	79
4.4. Hasil Uji KHM Larutan Standar Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	79
4.5. Hasil Uji KBM Larutan Standar Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	80
4.6. Hasil Uji KBM Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	80
4.7. Hasil Uji KBM Larutan Standar Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	80
4.8. Hasil Uji KBM Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri <i>Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa</i>	81
4.9. Hasil Uji KBM Terhadap Kontrol.....	81

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
3.1. Diagram Alur Pembuatan Liposom	82
3.2. Diagram Alur Pemurnian Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat.....	83
3.3. Diagram Alur Pengujian Aktivitas Antibakteri.....	84
3.4. Sertifikat Analisis Fosfatidilkolin	86
3.5. Sertifikat Analisis Kolesterol	87
3.6. Sertifikat Analisis Gentamisin Sulfat	89
3.7. Surat Bukti Penerimaan Isolat Bakteri dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia	90
4.1. Hasil Pemeriksaan Distribusi Ukuran Partikel Suspensi Liposom Kosong.	91
4.2. Hasil Pemeriksaan Distribusi Ukuran Partikel Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat	92



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Antibiotik adalah substansi yang dalam konsentrasi rendah dapat menghambat pertumbuhan dan reproduksi bakteri dan fungi (Koolman dan Roehm, 2005). Berdasarkan sifatnya (daya hancurnya) antibiotik dibagi menjadi dua, yaitu :

1. Antibiotik yang bersifat bakterisidal, yaitu antibiotik yang bersifat destruktif terhadap bakteri.
2. Antibiotik yang bersifat bakteriostatik, yaitu antibiotik yang bekerja menghambat pertumbuhan bakteri.

Pada saat ini antibiotik masih sangat dibutuhkan oleh manusia. Menurut Strohl (1999) ada beberapa alasan pentingnya eksplorasi senyawa dan teknologi farmasetika antibiotik baru. Pertama: seiring dengan perkembangan metode pengobatan yang menggunakan berbagai macam antibiotik, telah menimbulkan kasus munculnya mikroba patogen yang resisten terhadap beberapa antibiotik yang berkaitan dengan penggunaan antibiotik tersebut. Sebagai contoh timbulnya mikroba patogen yang tahan terhadap penisilin, kasus *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Vancomycin-Resistant Enterococci* (VRE) khususnya *Enterococcus faecium* dan *Enterococcus faecalis*, dan β -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Kedua: dalam beberapa kasus antibiotik yang memiliki aktivitas biologi yang sangat tinggi tetap mampu dihambat aktivitasnya atau diinaktifkan oleh bakteri patogen. Sebagai contoh kasus infeksi yang disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* pada seseorang yang menderita *cystic fibrosis* pernah menjadi permasalahan serius pada dunia kedokteran. Ketiga: antibiotik memiliki keterbatasan pada sistem organ tubuh, yaitu pada kasus tertentu beberapa antibiotik memiliki sifat toksik terhadap salah satu organ yang peka terhadap antibiotik tersebut. Sebagai contoh pada kasus penggunaan gentamisin dan aminoglikosida lainnya akan dibatasi efektivitasnya karena antibiotik tersebut berhubungan dengan nefrotoksisitas dan ototoksisitas.

Antibiotik aminoglikosida digunakan secara tunggal atau kombinasi dengan penisilin atau sefalosporin untuk mengobati infeksi serius yang disebabkan oleh bakteri aerob Gram negatif maupun Gram positif. Namun, efek samping berupa nefrotoksisitas, ototoksisitas dan paralisis neuromuskular dari antibiotik aminoglikosida membatasi aplikasi klinis dari antibiotik golongan ini. Disamping itu, resistensi bakteri terhadap antibiotik golongan aminoglikosida meningkat yang bersumber dari elaborasi termediasi plasmid dari enzim pendegradasi aminoglikosida (Omri dan Ravaoarino, 1995). Enzim pendegradasi aminoglikosida antara lain adalah *aminoglycoside modifying enzymes* (*aminoglycosides acetyltransferase*, *aminoglycoside phosphorylase*, dan *aminoglycoside adenyl transferase*).

Liposom, sebagai karier untuk sistem penghantaran obat, telah terbukti sukses meningkatkan aktivitas antibakteri banyak senyawa obat dari berbagai kelas antibiotik. Alasan utama dari penggunaan liposom sebagai karier adalah kegunaan liposom dalam hal pelepasan obat terkendali, menurunkan regimen dosis dan atau memungkinkan pengadministrasian dosis yang lebih besar dengan toksisitas yang lebih rendah dan meningkatkan sensitivitas dari bakteri terhadap obat yang terenkapsulasi liposom dengan menghindari enzim serta inaktivasi secara imunologi dan kimia. Enkapsulasi aminoglikosida menggunakan liposom telah terbukti secara nyata mengubah *self life* dan *area under curve* (AUC) dan menyebabkan pergeseran dalam hal akumulasi obat dari ginjal ke organ lainnya, dengan demikian berpotensi untuk menurunkan nefrotoksisitas. Melalui penelitian terdahulu diketahui bahwa enkapsulasi liposom meningkatkan aktivitas antibakteri piperasilin dan gentamisin terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* secara *in vitro* (Omri dan Ravaoarino, 1995).

Pada penelitian terdahulu telah dilakukan penelitian pengaruh enkapsulasi liposom terhadap aktivitas antibakteri golongan aminoglikosida yaitu amikasin, netilmisin, dan tobramisin. Melalui penelitian ini diketahui bahwa amikasin dan tobramisin terenkapsulasi liposom memiliki aktivitas antibakteri yang mirip dengan amikasin dan tobramisin bebas. Berbeda dengan netilmisin, netilmisin terenkapsulasi liposom memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan

netilmisin bebas. Baik aktivitas amikasin, netilmisin, dan tobramisin diujikan terhadap bakteri Gram negatif dan Gram positif (Omri dan Ravaoarino, 1995).

Penelitian pengaruh enkapsulasi liposom terhadap aktivitas antibakteri gentamisin sulfat telah dilakukan sebelumnya. Hasil penelitian tersebut menyatakan bahwa enkapsulasi liposom dapat meningkatkan aktivitas antibakteri gentamisin sulfat. Kesimpulan tersebut didapat melalui hasil uji konsentrasi hambat minimum dan konsentrasi bunuh minimum dimana konsentrasi hambat minimum untuk gentamisin sulfat tidak terenkapsulasi liposom terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 adalah 4 ppm dan terhadap dua bakteri uji *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* PA-1 dan PA-136411 secara berurutan adalah 16 dan 512 ppm sedangkan untuk gentamisin sulfat terenkapsulasi liposom konsentrasi hambat minimum terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 adalah 1 ppm dan terhadap dua bakteri uji *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* PA-1 dan PA-136411 secara berurutan adalah 8 dan 32 ppm. Hasil untuk konsentrasi bunuh minimum juga memberikan kesimpulan yang sama dengan hasil konsentrasi hambat minimum yaitu terdapat peningkatan aktivitas antibakteri gentamisin sulfat jika dienkapsulasi dengan liposom. Pada penelitian tersebut digunakan 1,2-Dimiristoil-*sn*-gliserol-3-fosfokolin (DMPC) sebagai lesitin pembentuk membran liposom dimana harga lesitin jenis ini cukup mahal. Maka dari itu, pada penelitian kali ini digunakan fosfatidilkolin kuning telur yang dari aspek harga terbilang lebih murah daripada 1,2-Dimiristoil-*sn*-gliserol-3-fosfokolin (DMPC) sehingga diharapkan dengan biaya yang lebih murah dicapai efek terapi yang sama (Rukholm *et al*, 2005).

Gentamisin sulfat tersedia sebagai larutan steril dalam vial atau ampul 60 mg/1,5 mL; 80 mg/2 mL; 120 mg/3 mL dan 280 mg/2 mL. Pemberian dengan rute injeksi mengharuskan sediaan gentamisin sulfat sebagai sediaan steril. Pemberian dengan rute injeksi menjadi pilihan terbaik untuk pemberian gentamisin sulfat karena hanya kurang dari 1% dari dosis akan diabsorpsi jika diberikan secara oral dan rektal serta akan berpenetrasi dengan sangat lambat jika diberikan secara intradermal.

1.2. Perumusan Masalah dan Ruang Lingkup

Masalah yang diangkat dalam penelitian ini adalah apakah enkapsulasi liposom dapat meningkatkan aktivitas antibakteri dari gentamisin sulfat. Ruang lingkup penelitian ini adalah Farmasetika-Mikrobiologi Eksperimental.

1.3. Jenis Penelitian dan Metode yang Digunakan

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode hidrasi lapis tipis untuk enkapsulasi liposom gentamisin sulfat, metode dilusi cair untuk penentuan konsentrasi hambat minimum dan teknik penipisan lempeng agar untuk penentuan konsentrasi bunuh minimum.

1.4. Hipotesis

Enkapsulasi liposom dapat meningkatkan aktivitas antibakteri gentamisin sulfat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*.

1.5. Tujuan Penelitian

Mengetahui efek enkapsulasi liposom terhadap aktivitas antibakteri gentamisin sulfat pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Liposom

Liposom merupakan struktur tertutup berbentuk sferis, yang dibentuk dari lipid *bilayer* melengkung yang menjerap fase air. Ukuran dari liposom berkisar antara 20 nm hingga beberapa mikrometer dan mungkin disusun dari satu atau beberapa membran konsentris, masing-masing dengan ketebalan sekitar 4 nm. Liposom memiliki sifat yang menarik karena karakteristik amfifilik dari lipid yang mampu menjadikan liposom sebagai pembawa obat yang baik. Obat yang bersifat hidrofilik akan terjerap pada bagian *aqueous* dari vesikel sedangkan yang lipofilik akan terjerap pada bagian lipid dari vesikel (Windholz, 1976).

Liposom memiliki berbagai keuntungan, yaitu :

- a. Liposom memiliki bagian lipofil maupun hidrofil sehingga dapat digunakan untuk obat yang amfifatik, hidrofob dan hidrofil (Windholz, 1976)
- b. Liposom dapat dikarakterisasi baik secara kimia dan fisika
- c. Liposom cenderung biokompatibel karena bersifat biodegradable.
- d. Kurang toksik dan dengan imunogenitas rendah
- e. Liposom bisa digunakan sebagai pembawa obat untuk lepas terkendali
- f. Liposom membantu menurunkan paparan obat yang toksik terhadap jaringan yang sensitif
- g. Liposom dapat diberikan melalui berbagai rute pemberian
- h. Farmakokinetik dan biodistribusi liposom dapat dikendalikan dari komposisi lipid dan ukuran

Klasifikasi liposom berdasarkan parameter struktur (Mayesm *et al.*, 2003)

- a. Vesikel *multilamellar*
 1. *Multilamellar large vesicle* berukuran lebih besar dari 0,5 μm (MLV)
 2. *Oligolamellar Vesicle* berukuran antara 0,1-1 μm (OLV)
- b. Vesikel *unilamellar*
 1. Vesikel *unilamellar* kecil berukuran 20-100 nm (SUV)
 2. Vesikel *unilamellar* besar berukuran lebih besar dari 100 nm (LUV)
 3. Vesikel ukuran raksasa berukuran lebih dari 1 μm (GUV)

c. Vesikel multivesikular berukuran lebih dari 1 μm . (MVV)

Beberapa metode pembuatan liposom (Swarbrick dan Boylan, 1994)

a. Metode Lapis Tipis

Metode lapis tipis umumnya menghasilkan liposom dengan tipe MLV atau SUV. Lapis tipis lemak yang mengandung fosfolipid dibentuk di dalam dinding labu gelas setelah fase organik diuapkan sempurna dengan evaporator, kemudian dibiarkan semalaman agar tercapai kondisi kesetimbangan dengan lingkungan

Setelah itu lapis tipis dihidrasi dengan penambahan larutan dapar. Obat yang dienkapsulasi dapat ditambahkan ke dalam pelarut organik yang mengandung fosfolipid sebelum lapis tipis terbentuk atau ke dalam larutan dapar. Pengocokan pada suhu transisi ($56\text{-}62^\circ\text{C}$) akan membentuk suspensi MLV.

Untuk mengurangi ukuran liposom dan mempersempit rentang distribusi ukuran dapat dilakukan dengan ekstrusi. Ekstrusi adalah tahap pengecilan ukuran yang sesuai, dapat dilakukan melalui membran filter polikarbonat dengan ultrasonikasi sehingga dihasilkan dispersi SUV.

b. Metode Injeksi

Pelarut organik diinjeksikan ke dalam fase air dalam kondisi eksperimen yang berbeda, seperti temperatur fase air dan pelarut organik, kecepatan injeksi dan kecepatan pengadukan.

Ada dua metode injeksi, antara lain:

1. Injeksi eter

Lapisan lipid dan eter diinjeksikan ke dalam fase air yang berisi zat yang akan dienkapsulasi pada suhu $55\text{-}65^\circ\text{C}$, hasilnya berupa LUV. Perbedaan utamanya terlihat pada lambatnya kecepatan injeksi dan perbedaan suhu antara larutan yang diinjeksikan dengan fase air.

2. Injeksi etanol 96%

Pada awalnya, injeksi etanol 96% adalah suatu alternatif untuk membuat SUV tanpa sonifikasi. Lipid dilarutkan dalam etanol 96%, kemudian diinjeksikan pada fase air yang mengalami pengadukan dengan alat pengaduk. MLV yang besar dan heterogen dapat diperoleh dengan cara meningkatkan konsentrasi lipid. Larutan lesitin pada pelarut organik disiapkan pada suhu tinggi dan diinjeksikan pada fase air yang dipanaskan.

c. Metode Demulsifikasi

1. *Reverse phase evaporation*

Vesikel *reverse phase evaporation* umumnya menghasilkan LUV yang dapat meningkatkan serapan untuk air dan zat polar. Mula-mula fosfolipid dilarutkan dalam eter atau pelarut lain yang mudah menguap, tambahkan fase air kemudian dikocok dengan ultrasonikasi. Pengecilan ukuran, homogenisasi ukuran dan penghilangan obat bebas sama dengan prosedur lapis tipis LUV yang memiliki kompartemen air yang cukup tinggi, sehingga baik digunakan untuk mengenkapsulasi obat yang bersifat polar.

2. Emulsi ganda

Pembuatan sama dengan *reverse phase evaporation* hanya saja dimulai dari mikroemulsi air dalam minyak

Beberapa mekanisme pembentukan liposom (Lasic, 1995; Swarbrick dan Boylan, 1994):

a. Teori pertunasan (*budding off*)

Dimana berbagai cara penekanan pada fosfolipid yang terhidrasi, dalam susunan *lamellar* yang teratur, menyebabkan terbentuknya tunas dari lapis ganda lipid menuju ke arah ukuran yang tetap.

b. Teori fragmen lapis ganda lipid yang terhidrasi

Terjadi ketidakstabilan termodinamika saat permukaan hidrofobik terpapar fase air sehingga bergabung dengan fragmen lain untuk membentuk vesikel lemak. Ketidakstabilan termodinamika pada bagian tepi dari fragmen lapis ganda lipid menyebabkan pelengkungan dan ketika fragmen lapis ganda lipid saling berdekatan terbentuklah vesikel.

2.2. Fosfolipid

Fosfolipid merupakan golongan molekul ampifilik yang paling sering digunakan untuk penggunaan farmasetika. Berdasarkan asal perolehannya, fosfolipid dapat dikelompokkan menjadi empat kelompok (Swarbrick dan Boylan, 1994):

1. Fosfolipid yang berasal dari alam

Di alam ini terdapat dua sumber utama dari fosfolipid, yaitu telur dan kacang kedelai. Fosfolipid yang dapat diperoleh dari telur antara lain *phosphatidylcholine* (PC), *phosphatidylethanolamine* (PE), dan *sphingomyelin* (SPM). Sedangkan dari kacang kedelai, fosfolipid yang dapat diperoleh antara lain PC, PE, dan *phosphatidylinositol* (PI). Perbedaan antara fosfolipid yang diperoleh dari telur dan fosfolipid yang diperoleh dari kacang kedelai adalah letak rantai asil yang tak jenuh, di mana pada fosfolipid yang diperoleh dari telur memiliki rantai asil jenuh pada posisi 1 dan rantai asil tidak jenuh pada pada posisi 2. Sedangkan fosfolipid yang berasal dari kacang kedelai memiliki rantai asil tak jenuh baik pada posisi 1 maupun 2.

2. Fosfolipid Alam Termodifikasi

Merupakan fosfolipid dari alam yang mengalami modifikasi struktur kimia melalui proses tertentu seperti hidrogenasi parsial atau total guna mengurangi tingkat ketidakjenuhan. Dengan demikian fosfolipid alam termodifikasi diharapkan akan memiliki bentuk yang lebih baik dan lebih tahan terhadap oksidasi daripada bentuk asalnya.

3. Fosfolipid Semisintesis

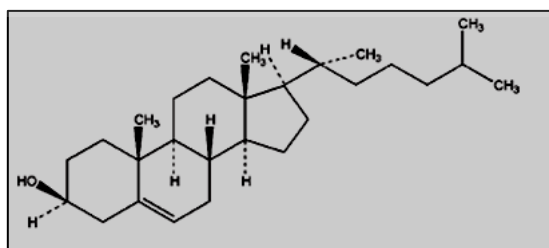
Rantai asil dari fosfolipid alam secara kimia digantikan posisinya oleh rantai asil tertentu yang dikehendaki.

4. Fosfolipid Sintesis

Golongan senyawa fosfolipid yang secara penuh dibuat melalui jalur sintesis kimia.

2.3. Kolesterol

Rumus struktur kolesterol



Gambar 2.1. Struktur Bangun Kolesterol

[Sumber: American Pharmaceutical Association, 2009]

Kolesterol berupa serbuk atau granul berwarna putih atau agak sedikit kekuningan yang mudah larut dalam aseton, larut dalam alkohol, eter dan benzen, tetapi praktis tidak larut dalam air. Kolesterol merupakan senyawa steroid yang penting karena menjadi prekursor sejumlah besar senyawa steroid yang sama pentingnya, seperti asam empedu, hormon korteks adrenal, hormon seks, vitamin D, glikosida kardiak, sitosterol dalam dunia tumbuhan dan beberapa alkaloid (American Pharmaceutical Association, 1994; Mayesm *et al.*, 2003; Reynold, 1982).

Kolesterol terdapat di dalam jaringan dan lipoprotein plasma dan dapat dalam bentuk kolesterol bebas atau gabungan dengan asam lemak rantai-panjang sebagai ester kolesterol. Kolesterol merupakan prekursor semua senyawa steroid lainnya dalam tubuh, seperti kortikosteroid, hormon seks, asam empedu dan vitamin D. Kolesterol secara khas adalah produk metabolisme hewan dan karenanya terdapat di makanan yang berasal dari hewan seperti kuning telur, daging, hati dan otak (Chattopadhyay *et al.*, 1988).

Keberadaan kolesterol dalam liposom akan meningkatkan stabilitas dengan menurunkan mobilitas molekul dan mengurangi permeabilitasnya sehingga akan meningkatkan rigiditas dinding vesikel pada konsentrasi optimum. Penambahan kolesterol yang melewati batas optimum akan menyebabkan lapis tipis liposom yang terbentuk menjadi kaku, sehingga pengembangan saat hidrasi tidak maksimal. Apabila terlalu sedikit, maka dinding vesikel menjadi kurang kokoh. Banyak celah yang dapat dilalui air sehingga memungkinkan vesikel beragregasi. Kolesterol harus disimpan dalam keadaan tertutup rapat dan terlindung dari sinar matahari supaya tetap stabil (American Pharmaceutical Association, 2000).

2.4. Antibakteri

Berdasarkan mekanisme kerjanya antibakteri dibagi dalam lima kelompok (Ganiswara *et al.*, 1995; Idris dan Dalima, 1993; Jawetz, Malnick dan Adelberg, 1989):

a. Antibakteri yang mengganggu sintesis dinding sel bakteri

Dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan yaitu komponen utama yang memberi bentuk dan kekakuan pada bakteri. Obat yang termasuk dalam kelompok

ini adalah penisilin dan sikloserin. Oleh karena tekanan osmotik dalam sel kuman lebih tinggi daripada di luar sel maka kerusakan dinding sel akan menyebabkan terjadinya lisis.

b. Antibakteri yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri

Antibakteri dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel bakteri. Antiseptik yang mengubah tegangan permukaan (*surface active agents*), dapat merusak permeabilitas selektif dari membran sel bakteri. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain. Contohnya fenol dan ammonium kuartener.

c. Antibakteri yang menghambat metabolisme sel mikroba

Bakteri membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Bakteri harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoat (PABA). Apabila sulfonamida atau sulfon bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang non fungsional. Akibatnya kehidupan bakteri akan terganggu. Dengan mekanisme kerja ini diperoleh efek bakteriostatik. Contoh senyawa yang termasuk kelompok ini adalah sulfonamida.

d. Antibakteri yang menghambat sintesis protein sel mikroba

Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah golongan aminoglikosida, makrolida, linkomisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol. Untuk kelangsungan hidupnya, sel bakteri perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S.

Antibiotik aminoglikosida berkaitan dengan komponen ribosom 30S dan menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel bakteri.

Antibiotik makrolida berkaitan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida.

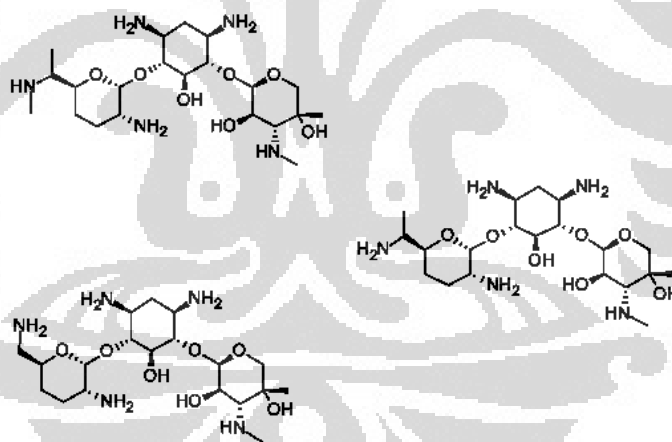
Akibatnya rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino baru.

Linkomisin juga berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat sintesis protein. Tetrasiklin berikatan dengan ribosom 30S dan menghalangi masuknya kompleks tRNA-asam amino pada lokasi asam amino. Kloramfenikol berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat pengikatan asam amino baru pada rantai polipeptida oleh enzim peptidil transferase.

e. Antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri

Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini adalah rifampisin dan golongan kuinolon. Rifampisin berikatan dengan enzim polimerase-RNA (pada sub unit), sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Golongan kuinolon menghambat enzim DNA girase pada kuman yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa muat dalam sel bakteri yang bakteri yang kecil.

2.5. Gentamisin Sulfat (Reynold, 1982)



Gambar 2.2. Struktur Bangun Gentamisin Sulfat

[Sumber : CAS Database List]

Gentamisin sulfat adalah campuran kompleks dari gentamisin C₁ sulfat, gentamisin C_{1A} sulfat dan gentamisin C₂ sulfat. Gentamisin sulfat dihasilkan oleh pembiakan *Micronospora purpurea*. Potensi gentamisin sulfat setara dengan tidak kurang dari 590 µg per mg gentamisin, dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan. Jika dikeringkan, gentamisin sulfat mengandung 31% sampai 34%

sulfat dan tidak kurang dari 590 unit gentamisin per mg; 80000 unit gentamisin sulfat setara dengan 80 mg gentamisin sulfat.

Pemerian gentamisin sulfat adalah serbuk berwarna putih sampai kekuningan yang mengandung tidak lebih dari 15% air. Gentamisin sulfat larut dalam air, praktis tidak larut dalam alkohol, kloroform, dan eter. Larutan gentamisin sulfat dalam air memiliki perputaran bidang polarisasi ke kanan (*dextrorotatory*). Larutan gentamisin sulfat dengan konsentrasi 4% dalam air memiliki pH 3,5 sampai 5,5. Larutan gentamisin sulfat disterilisasi dengan cara filtrasi. Penyimpanan gentamisin sulfat dianjurkan dalam wadah tertutup rapat.

Gentamisin sulfat inkompatibel dengan amfoterisin, sepalosporin, eritromisin, heparin, penisilin, sodium bikarbonat, dan natrium sulfadiazid. Larutan *aqueous* gentamisin sulfat stabil selama satu minggu dan akan berubah menjadi coklat jika diautoklaf. Hal ini dapat dihindari dengan menambahkan natrium metabisulfit dengan konsentrasi $\leq 80 \mu\text{g}$ per mL.

Gentamisin sulfat adalah antibiotika golongan aminoglikosida yang mempunyai potensi tinggi dan berspektrum luas terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan sifat bakterisid. Gentamisin sulfat mempunyai rentang terapi sempit, bersifat nefrotoksik dan ototoksik serta mempunyai variabilitas farmakokinetik interindividu cukup lebar, maka pemantauan kadar obat dalam darah pada penderita dengan gangguan fungsi ginjal adalah suatu kebutuhan agar keamanan dan efikasi terapi tercapai. Hal ini juga penting karena profil dosis dan kadar gentamisin dalam darah sukar diprediksi, terutama kadar puncak obat dan waktu paruh eliminasi (*Peak-serum levels dan elimination half-life*) (McEvoy, Miller, dan Litvak, 2005).

Cara kerja gentamisin sulfat sebagai antibakteri adalah dengan berkaitan dengan komponen ribosom 30S dan menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel bakteri. Masalah resistensi yang sering menyebabkan gentamisin sulfat tidak lagi efektif sebagai antibakteri diantaranya adalah karena bakteri patogen menghasilkan enzim yang dapat memodifikasi struktur gentamisin sulfat dan golongan aminoglikosida lainnya, kekakuan membran luar bakteri, dan overekspresi dari *efflux pump*.

2.6. Evaluasi Liposom

2.6.1. Morfologi (Bentuk Fisik)

Evaluasi bentuk fisik liposom dilakukan dengan evaluasi terhadap ukuran dan lapisan dari liposom. Untuk dapat melihat ukuran liposom yang mikroskopik dibutuhkan suatu instrumen berupa mikroskop optik atau *Scanning Electron Microscope* (SEM), sedangkan untuk mengukur ketebalan yang terbentuk diperlukan instrumen yang dapat menganalisis liposom secara tiga dimensi menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM).

Karena keterbatasan mikroskop optik dalam melihat partikel yang berukuran nano maka untuk mengevaluasi liposom berukuran nano dibutuhkan alat *Scanning Electron Microscope* yang dapat mengukur ukuran partikel dan mengevaluasi bentuk partikel serta morfologinya. Teknik ini membutuhkan keadaan sampel yang kering dan juga diperlukan adanya agen pengontras yang diaplikasikan ke permukaan partikel, contohnya emas atau paladium (Williams dan Vaughn, 2007).

Teknik yang serupa juga dengan SEM, yaitu *Transmission Electron Microscopy* dapat digunakan untuk mengevaluasi morfologi dari nanopartikel. Teknik ini membutuhkan kondisi vakum dan sampel harus dalam keadaan kering. Tomografi TEM memiliki resolusi gambar yang lebih tinggi dan gambar dapat diperbesar lebih banyak daripada menggunakan SEM (Williams dan Vaughn, 2007).

2.6.2. Distribusi ukuran partikel

Distribusi ukuran partikel dapat diukur dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* berupa *Laser Light Scattering*, *Coulter Counter* atau *DLS/Photon Correlation Spectroscopy*. Difraksi sinar laser pada *Laser Light Scattering* menggunakan cahaya difraksi, cahaya difusi atau keduanya dalam menghitung distribusi ukuran partikel. Analisis yang akurat dapat dilakukan pada partikel dalam rentang ukuran diameter 10 nm – 1 mm. Pada pengukuran dengan *Coulter Counter*, pengenceran dispersi diperlukan dan akurasinya dibatasi oleh partikel dengan ukuran diameter diatas 400 nm. Distribusi ukuran partikel dihitung melalui variasi tahanan elektrik ketika dispersi partikel melewati dua elektroda. Teknik ini membutuhkan persyaratan partikel yang sferis agar dapat mengukur

volume yang akurat. Pengukuran distribusi ukuran partikel menggunakan DLS memerlukan pengenceran dispersi dari partikel yang berukuran dibawah 6 μm .

2.6.3. Daya jerap obat (Omri, Suntres, dan Shek, 2002)

Salah satu evaluasi daya jerap obat adalah dengan menggunakan pengujian mikrobiologi. Pengujian mikrobiologi yang digunakan adalah uji konsentrasi hambat minimum metode cakram.

Pengukuran daya jerap liposom dilakukan dengan membandingkan konsentrasi obat yang terjerap dengan konsentrasi total dengan rumus :

$$\%EP = \frac{C_{\text{terjerap}}}{C_t} \times 100\%$$

C terjerap adalah konsentrasi obat yang terjerap liposom, yaitu merupakan selisih dari konsentrasi total obat dengan konsentrasi akumulatif obat yang tidak terjerap liposom. C_t adalah konsentrasi total obat. Konsentrasi obat didapat dari hasil pengukuran serapan larutan.

Untuk mengetahui konsentrasi obat yang terjerap liposom terlebih dahulu dipisahkan obat yang terjerap liposom dengan yang tidak terjerap liposom. Terdapat 2 cara untuk memisahkan obat yang terjerap liposom dengan yang tidak terjerap liposom yaitu dengan cara dialisis dan sentrifugasi. Setelah dipisahkan, baik melalui proses dialisis maupun sentrifugasi akan didapati *supernatant* dan suspensi liposom murni (sudah tidak didapati lagi obat yang tidak terjerap liposom). Baik *supernatant* maupun suspensi liposom murni dapat digunakan untuk pengujian daya jerap obat. Namun, untuk suspensi liposom murni tidak dapat langsung diujikan. Membran lipid suspensi liposom harus dipecah terlebih dahulu dengan menggunakan zat lain sebagai contoh adalah Triton X-100.

2.7. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri Gram negatif dengan klasifikasi sebagai berikut (Bryan, Bryan, dan Bryan, 1962):

Kingdom : Prokaryota
 Divisi : Bacteria
 Kelas : Schizomycetes
 Ordo : Eubacteriales
 Famili : Pseudomonadeae

Genus : *Pseudomonas*

Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa adalah salah satu dari *Pseudomonas sp* yang sering terdapat pada infeksi oportunistik dan infeksi nosokomial pada pasien *immunocompromise* sebagai akibat dari luka bakar atau trauma yang berat, penyakit seperti kanker, diabetes, dan *cystic fibrosis* (CF), *immunosuppression*, dan operasi besar. *Pseudomonas aeruginosa* meningkat secara klinis karena resisten terhadap berbagai antimikroba dan memiliki kemampuan untuk mengembangkan tingkat *Multidrug Resistance* (MDR) yang tinggi, termasuk pada penisilin dan sefalosporin generasi pertama dan kedua, tetrasiklin, kloramfenikol, dan makrolid. Antimikroba yang mempunyai aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa* meliputi: aminoglikosida (gentamisin, amikasin, tobramisin), quinolon (ciprofloxacin dan levofloxacin, tapi tidak moksifloxacin), sefalosporin (seftazidim, sefepime, sefpirome, tapi tidak sefuroksim, seftriakson, sefotaksim), ureidopenisilin (piperasilin, ticarsilin: *Pseudomonas aeruginosa* pada dasarnya resisten terhadap penisilin lain), carbapenem (meropenem, imipenem, tapi tidak ertapenem), polimiksin (polimiksin B dan colistin), monobaktam (aztreonam). Antimikroba-antimikroba ini harus diberikan secara injeksi, kecuali fluoroquinolon, karena di beberapa rumah sakit, penggunaan fluoroquinolon dibatasi hanya untuk infeksi berat untuk menghindari berkembangnya resistensi *Pseudomonas aeruginosa*.

Infeksi *Pseudomonas* yang serius sering terjadi di rumah sakit (infeksi nosokomial). *Pseudomonas aeruginosa* biasanya ditemukan di tempat yang lembab, seperti bak cuci dan wadah air kemih. Bahkan organisme ini ditemukan dalam cairan antiseptik tertentu. Infeksi paling serius terjadi pada orang yang sistem kekebalannya terganggu, baik karena pengobatan (contoh: kemoterapi dan pemberian imunosupresan) maupun penyakit (contoh: AIDS) yang disebut juga infeksi oportunistik. *Pseudomonas aeruginosa* bisa menginfeksi darah, kulit, tulang, telinga, mata, saluran kemih, katup jantung dan paru-paru. Luka bakar juga bisa terinfeksi oleh *Pseudomonas aeruginosa* yang menyebabkan terbentuknya nanah berwarna hijau kebiruan pada luka bakar .

2.8. *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa memiliki beberapa faktor virulensi yang menunjang patogenitas dan resistensi bakteri tersebut terhadap beberapa agen antimikrobia. Hal ini meliputi kapsul alginat yang dapat memiliki mukus, keberadaan eksoenzim S, elastase dan fosfolipase C, serta sebuah *Chaperone Usher pathway* yang aktif.

Pseudomonas aeruginosa telah menampakkan sifat resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik. Melalui sebuah studi yang dilakukan di Tunis, Tunisia diketahui bahwa 60,9% isolat *Pseudomonas aeruginosa* resisten terhadap piperasilin, 53,4% resisten terhadap ceftazidim, 37,6% terhadap imipenem, 70,6% terhadap cefsulodime, 59,3% terhadap tobramisin, 80% terhadap gentamisin, 62,4% terhadap amikasin, dan 53,4% terhadap siprofloksasin. Studi yang sama juga dilakukan di Turki dan didapati bahwa 70% *Pseudomonas aeruginosa* resisten terhadap gentamisin dan tobramisin demikian pula di Spanyol dan Italia didapati hasil yang serupa.

Terdapat 3 kelas resistensi pada *Pseudomonas aeruginosa* yaitu resistensi intrinsik, resistensi didapat, dan resistensi adaptif (Breidenstein *et al.*, 2011). Resistensi intrinsik (*intrinsic resistance*) bersifat stabil dan diwariskan. Mekanisme dari resistensi intrinsik dikarenakan rendahnya permeabilitas membran bakteri, produksi enzim β -laktamase dan overekspresi dari *efflux pump*. Resistensi didapat (*acquired resistance*) juga bersifat stabil dan diwariskan. Mekanisme dari resistensi ini adalah transfer horizontal serta mutasi yang dapat menyebabkan berkurangnya pengambilan zat ke dalam sel bakteri dan overekspresi dari *efflux pump*. Resistensi adaptif (*adaptive resistance*) merupakan resistensi yang timbul karena dampak kondisi lingkungan sehingga resistensi tipe ini juga bergantung pada kondisi lingkungan. Mekanisme resistensi adaptif adalah perubahan ekspresi gen termasuk overekspresi dari enzim β -laktamase dan *efflux pump* karena faktor yang memicu ekspresi dari gen yang mengatur ekspresi enzim β -laktamase dan *efflux pump*.

2.9. Uji Aktivitas Antibakteri

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroba dikenal sebagai aktivitas bakteriostatik, dan ada yang

bersifat membunuh mikroba dikenal sebagai aktivitas bakterisid. Kadar hambat minimal (KHM) antibakteri adalah kadar minimal dari antibakteri yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Kadar bunuh minimal (KBM) antibakteri adalah kadar minimal dari antibakteri yang diperlukan untuk membunuh bakteri. Antibakteri dapat meningkat aktivitasnya dari bakteriostatik menjadi bakterisid, apabila kadar antibakteri tersebut ditingkatkan lebih besar dari KHM.

Metode yang umum dipakai untuk menguji aktivitas antibakteri adalah (Lorian, 1980) :

a. Metode pengenceran agar (Teknik dilusi)

Pada metode ini, aktivitas zat antibakteri ditentukan sebagai kadar hambat minimal (KHM), yaitu zat antibakteri dengan konsentrasi terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Metode ini dapat berupa :

- Cara pengenceran serial dalam tabung

Pada cara ini zat antibakteri yang akan diuji aktivitasnya diencerkan secara serial dengan pengenceran kelipatan dua dalam media cair (contoh: kaldu nutrisi untuk bakteri dan *sabouraud* cair untuk jamur) dan selanjutnya diinokulasikan dengan bakteri uji. Setelah itu diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18 sampai 24 jam (untuk bakteri) dan pada suhu kamar selama 1 sampai 2 minggu (untuk jamur)

- Cara penipisan lempeng agar

Pada cara ini zat antibakteri yang akan ditentukan aktivitas antibakterinya diencerkan secara serial dengan metode pengenceran kelipatan dua di dalam media agar yang masih dalam fase cair bersuhu 40°C sampai 50°C yang kemudian dituangkan ke dalam cawan petri. Setelah lempeng agar membeku, ditanam inokulum bakteri dan kemudian diinkubasi pada suhu dan jangka waktu yang sesuai dengan pertumbuhan bakteri yang diuji (18-24 jam, 37°C).

b. Metode difusi agar

Pada metode ini zat antibakteri yang akan ditentukan aktivitas antibakterinya berdifusi pada lempeng agar yang telah ditanami bakteri yang akan diuji. Dasar pengamatannya terbentuk atau tidaknya zona hambatan di sekeliling

cakram atau silinder yang berisi zat antibakteri (Pelczar, 1986). Metode difusi ini dapat dilakukan dengan cara :

- Cara parit (*ditch*)

Pada media agar yang ditanami inokulum dibuat parit kemudian diisi dengan zat antibakteri dan diinkubasikan pada suhu dan jangka waktu yang sesuai untuk jenis bakterinya. Pengamatan dilakukan atas ada atau tidaknya zona hambatan di sekeliling parit.

- Cara lubang atau cawan (*hole* atau *cup*)

Pada media agar yang telah ditanami inokulum dibuat lubang kemudian diisi dengan zat antibakteri. Modifikasi dari cara ini adalah meletakkan silinder pada media agar kemudian diisi dengan zat antibakteri. Setelah diinkubasi pada suhu dan jangka waktu yang sesuai dengan bakteri, pengamatan dilakukan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambatan di sekeliling lubang atau silinder.

- Cara cakram (*disc*)

Kertas cakram yang mengandung zat antibakteri diletakkan di atas lempeng agar yang telah ditanami inokulum kemudian diinkubasikan pada suhu dan jangka waktu yang sesuai dengan jenis bakterinya (18-24 jam, 37°C). Selanjutnya dilihat ada atau tidaknya zona hambatan disekeliling kertas cakram.

c. Turbidimetri

Pada metode ini, pengamatan aktivitas antibakteri didasarkan atas kekeruhan yang terjadi pada media pembenihan. Pertumbuhan bakteri juga dapat ditentukan dari perubahan yang terjadi pada sebelum dan sesudah inkubasi, yang dilakukan dengan mengukur serapannya secara spektrofotometri. Adanya pertumbuhan bakteri ditandai dengan peningkatan jumlah sel bakteri yang mengakibatkan meningkatnya kekeruhan. Kekeruhan yang terjadi umumnya berbanding lurus dengan serapannya yang berarti semakin banyak jumlah sel maka akan terlihat semakin keruh dan serapannya akan semakin besar

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi

Lokasi penelitian adalah di Laboratorium Farmasetika, Laboratorium Teknologi Sediaan Steril dan Laboratorium Mikrobiologi-Bioteknologi Departemen Farmasi Fakultas MIPA Universitas Indonesia Depok.

3.2. Alat

Timbangan analitik (Ohaus, Acculab), pH meter (Eutech Instruments), *hotplate* (Corning), *bio safety cabinet* (ESCO), inkubator (Memmet), pengaduk magnetik (Corning), evaporator HS-2005S-N Hahnvapor (Hahnshin Scientific Co.), *vortex mixer* model VM-2000 (Digisystem Laboratory), mikroskop konvokal (Olympus), *scanning electron microscope* (SEM) (Inspect F50), *Particle Size Analyzer* (PSA) (Malvern Zetasizer), autoklaf (Hirayama, Jepang), oven (Lab Line Instruments Inc), pipet mikro (Socorex), cakram kertas (Fiorroni), mikroskop optik, pembakar bunsen, ose ujung bulat, *glass beads*, *carbon tape conductivity*, labu bulat dan peralatan gelas lainnya.

3.3. Bahan

Fosfatidilkolin kuning telur (Sigma), kolesterol (Sigma), gentamisin sulfat (Fahrenheit), air suling (Brataco dan Fakultas Farmasi Universitas Indonesia), *aquabidest* (Ikapharmindo), kloroform pro analisis (Merck), Na₂HPO₄ (Merck), KH₂PO₄ (Merck), isolat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia), isolat *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* (Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia), gas N₂, suspensi standar McFarland III, media agar nutrisi (Difco), media kaldu Mueller-Hinton (Oxoid), media agar cetrimide (Merck), media tioglikoat (Difco), dan media agar Mueller-Hinton (Oxoid).

3.4. Metode Pelaksanaan

3.4.1. Pembuatan Liposom (Rukholm *et al.*, 2005)

Liposom dibuat dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis. Fosfatidilkolin kuning telur dan kolesterol ditimbang dengan perbandingan rasio molar 2:1 dan dilarutkan dalam 10 mL kloroform pro analis. Larutan dalam kloroform tersebut kemudian dievaporasi menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ selama 60 menit dengan kecepatan bervariasi antara 50 - 120 rpm dan kondisi vakum untuk menguapkan kloroformnya hingga terbentuk lapisan tipis. Lapisan tipis yang telah terbentuk kemudian dialiri gas nitrogen dan didiamkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, lapisan tipis di dalam labu *evaporator* dihidrasi dengan 30 mL larutan gentamisin sulfat dalam dapar fosfat steril pH 7,4 dengan konsentrasi 10 mg/mL sambil dikelupas dengan *glass beads* dengan kecepatan *rotary evaporator* sebesar 60 rpm hingga terbentuk suspensi berwarna putih susu. Suspensi kemudian di *vortex* selama 15 menit, disimpan dalam lemari pendingin.

Berikut adalah formulasi liposom yang akan dibuat:

Tabel 3.1. Formulasi Liposom

Bahan	Formulasi I	Formulasi II
Fosfatidilkolin kuning telur	800 mg	800 mg
Kolesterol	200 mg	200 mg
Gentamisin	-	300 mg

3.4.2. Pembuatan Larutan Stok Gentamisin Sulfat (Rukholm *et al.*, 2005)

Sebanyak 100 dan 200 mg gentamisin sulfat ditimbang dan masing-masing dilarutkan dalam 100 mL dapar fosfat steril pH 7,4. Setelah gentamisin larut sempurna, larutan disaring dengan filter bakteri lalu larutan dengan konsentrasi 2.000 ppm dibuat seri pengenceran dengan kelipatan dua sesuai metode Kirby-Bauer yaitu konsentrasi 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95; 0,98 ppm untuk uji konsentrasi hambat minimum dan larutan dengan konsentrasi 1.000 ppm dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25, dan 15,63 ppm untuk uji penjerapan liposom.

3.4.3. Evaluasi liposom (Saputra, 2011)

3.4.3.1. Morfologi Liposom

Evaluasi secara morfologi dilakukan dengan melihat bentuk dan ukuran liposom dengan menggunakan *scanning electron microscope* (SEM).

3.4.3.2. Pengukuran Distribusi Ukuran Partikel

Pengukuran distribusi ukuran partikel dilakukan pada suspensi liposom kosong dan suspensi liposom gentamisin sulfat menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). Larutan air suling dimasukkan ke dalam *fluid tank* sebagai *baseline*, kemudian sampel dimasukkan ke dalam *fluid tank* tetes demi tetes hingga konsentrasi mencukupi, setelah itu akan terukur ukuran partikel globul liposom.

3.4.3.3. Penentuan Efisiensi Penjerapan Liposom

a. Pemurnian Suspensi Liposom

Terlebih dahulu gentamisin sulfat yang terenkapsulasi liposom dipisahkan dengan gentamisin sulfat yang tidak terenkapsulasi liposom dengan sentrifugasi 50.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. *Supernatant* diambil lalu di resuspensikan. Prosedur ini dilakukan sebanyak 3 kali sehingga didapat 3 *supernatant*. Setiap *supernatant* hasil sentrifugasi diujikan secara mikrobiologi dengan metode cakram. Endapan hasil sentrifugasi tahap III diresuspensikan kembali sehingga diperoleh liposom murni.

b. Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Stok Gentamisin Sulfat dan Uji Mikrobiologi *Supernatant* dengan Metode Cakram

Kurva kalibrasi larutan stok gentamisin sulfat diperoleh dengan menggunakan uji aktivitas antibakteri metode cakram. Prosedur penentuan diameter zona hambat terhadap bakteri adalah sebagai berikut (Pelczar, 1985; Mueller, 1978) :

1. Pembuatan Inokulum Bakteri (Lorian, 1980)

Biakan bakteri yang telah berumur 24 jam pada agar miring diambil beberapa sengkeli dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10,0 mL *aquabidest* hingga diperoleh kekeruhan suspensi kuman yang sama dengan standar

McFarland III (10^9 CFU/mL) kemudian dilakukan pengenceran hingga diperoleh konsentrasi akhir 10^5 CFU/mL.

2. Penyiapan lempeng agar lapisan dasar (*base layer*)

Media agar nutrisi steril yang masih cair (suhu 40°C sampai 50°C) dituang secara aseptis sebanyak ± 20 mL ke dalam cawan petri steril yang berdiameter 12 cm dan dibiarkan hingga membeku

3. Pembuatan lapisan perbenihan bakteri (*seed layer*)

Lapisan perbenihan bakteri dibuat dengan cara menyiapkan ± 15 mL agar Mueller-Hinton yang masih cair (suhu 40°C sampai 50°C) dalam tabung reaksi volume 10 mL. Inokulum bakteri 10^5 CFU/mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi tersebut sebanyak 1,0 mL dan di-*vortex* hingga homogen. Campuran tersebut kemudian dituang ke dalam cawan petri yang sudah berisi lapisan dasar (*base layer*). Biarkan beberapa saat hingga membeku.

4. Penentuan diameter zona hambat

Cakram kertas berdiameter 6 mm diletakkan secara aseptis di atas permukaan perbenihan yang telah membeku dengan jarak tertentu. Sebanyak 20 μL larutan stok gentamisin sulfat dengan konsentrasi 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,63 ppm dan ketiga *supernatant* hasil pemurnian dengan sentrifugasi dipipetkan ke cakram kertas tersebut. Kemudian cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong.

5. Pembacaan hasil

Pembacaan hasil percobaan didasarkan pada zona hambatan yang terbentuk di sekeliling koloni bakteri dan dinyatakan dalam tiga kategori yaitu:

- a. Zona hambatan total yaitu apabila zona hambatan yang terbentuk disekeliling cakram kertas terlihat jernih
 - b. Zona hambatan parsial yaitu apabila zona hambatan yang terbentuk masih memperlihatkan adanya beberapa koloni bakteri
 - c. Zona hambatan nol yaitu apabila tidak ada zona hambatan yang terbentuk disekeliling cakram kertas
- ## 6. Hasil berupa konsentrasi dan zona hambat diinterpretasikan ke dalam persamaan regresi linier

7. Konsentrasi gentamisin sulfat bebas yang terdapat pada *supernatant* dihitung dengan mensubstitusikan zona hambat yang terdapat pada cakram kertas yang mengandung *supernatant* ke persamaan regresi linier.

c. Perhitungan Efisiensi Penjerapan Liposom

Jumlah gentamisin sulfat yang terjerap dalam liposom dihitung dengan cara mengurangi jumlah obat pada larutan awal yang digunakan untuk hidrasi dengan jumlah gentamisin sulfat bebas yang terdapat pada *supernatant* hasil sentrifugasi.

Pengukuran daya jerap liposom dilakukan dengan membandingkan konsentrasi obat yang terjerap dengan konsentrasi total dengan rumus :

$$\%EP = \frac{C_{\text{terjerap}}}{C_t} \times 100\%$$

C terjerap adalah konsentrasi gentamisin sulfat yang terjerap liposom, yaitu merupakan selisih dari konsentrasi total gentamisin sulfat dalam larutan yang digunakan saat hidrasi dengan konsentrasi akumulatif gentamisin sulfat yang tidak terjerap liposom. Ct adalah konsentrasi total gentamisin sulfat pada larutan gentamisin sulfat yang digunakan saat proses hidrasi.

3.4.4. Pembuatan Media Tioglikolat Cair

Media Tioglikolat Cair (Difco) dengan pH $7,1 \pm 0,2$ komposisinya :

Bacto kasion	15,00	g
Bacto ekstrak ragi	5,00	g
Bacto dekstroza	5,00	g
Natrium klorida	2,50	g
L-sistin	0,50	g
Natrium tioglikolat	0,50	g
Bacto agar	0,75	g
Rezazurin	0,001	g

Cara pembuatan:

Sebanyak 29,5 g bahan dilarutkan dalam 1 liter air suling kemudian dipanaskan hingga larut sempurna, lalu disterilkan dalam autoklaf 121°C selama 15 menit.

3.4.5. Uji Sterilitas

Pemeriksaan ini bertujuan untuk mengetahui sterilitas bahan yang akan digunakan, yaitu media perbenihan, cakram kertas, larutan stok gentamisin sulfat, suspensi liposom kosong dan suspensi liposom gentamisin sulfat. Untuk pemeriksaan ini digunakan media tioglikolat cair steril. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan 15 tabung reaksi steril yang dibagi menjadi 5 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 3 tabung reaksi (setiap sampel diuji triplo) dan 3 tabung reaksi yang lain digunakan sebagai kontrol media. Tiga tabung reaksi kelompok I masing-masing diisi dengan cakram kertas dan 10 mL media tioglikolat cair yang telah disterilkan. Tiga tabung reaksi kelompok II masing-masing diisi dengan 1 mL larutan stok gentamisin sulfat yang telah disaring menggunakan filter bakteri dan 9 mL media tioglikolat cair yang telah disterilkan. Tiga tabung reaksi kelompok III masing-masing diisi dengan 1 mL suspensi liposom kosong dan 9 mL media tioglikolat cair yang telah disterilkan. Tiga tabung reaksi kelompok IV masing-masing diisi dengan 1 mL suspensi liposom gentamisin sulfat dan 9 mL media tioglikolat cair yang telah disterilkan. Tiga tabung reaksi kelompok V masing-masing diisi dengan 10 mL media tioglikolat cair yang telah disterilkan sebagai kontrol media. Lima belas tabung reaksi tersebut diinkubasi selama 7 hari pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat pertumbuhan bakteri dalam tabung reaksi yang ditandai dengan perubahan larutan dalam tabung reaksi dari jernih menjadi keruh dan membentuk gumpalan seperti kapas. Bahan uji dinyatakan steril bila media tioglikolat cair tetap jernih (Anonim, 1994).

Pemeriksaan sterilitas terhadap media agar nutrisi, agar cetrimide, kaldu Mueller-Hinton dan agar Mueller-Hinton dilakukan dengan cara menuang masing-masing agar steril ke dalam cawan petri atau tabung reaksi steril, kemudian dibiarkan membeku dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan melihat apakah ada pertumbuhan jamur, bakteri,

atau kontaminan lain. Jika media terlihat jernih, maka media tersebut dinyatakan steril (Anonim, 1994).

3.4.6. Suspensi McFarland III

Suspensi McFarland adalah suspensi yang mengandung BaSO_4 digunakan sebagai pembanding kekeruhan terhadap jumlah kuman adalah sebagai berikut :

Tabel 3.2. Komposisi larutan McFarland III

No.	Larutan 1% H_2SO_4 (mL)	Larutan 1% BaCl_2 (mL)	Jumlah Bakteri
10	9,0	1,0	$3,0 \times 10^9$
9	9,1	0,9	$2,7 \times 10^9$
8	9,2	0,8	$2,4 \times 10^9$
7	9,3	0,7	$2,1 \times 10^9$
6	9,4	0,6	$1,8 \times 10^9$
5	9,5	0,5	$1,5 \times 10^9$
4	9,6	0,4	$1,2 \times 10^9$
3	9,7	0,3	$0,9 \times 10^9$
2	9,8	0,2	$0,6 \times 10^9$
1	9,9	0,1	$0,3 \times 10^9$

3.4.7. Pembuatan Media Agar Nutrisi

Agar nutrisi (Difco) dengan pH $6,8 \pm 0,2$ komposisinya :

Bacto ekstrak daging sapi	3,00	g
Bacto pepton	5,00	g
Bacto agar	15,00	g

Cara pembuatan :

Sebanyak 23 g bahan dilarutkan dalam 1 liter air suling, kemudian dipanaskan hingga larut sempurna, lalu disterilkan dalam autoklaf 121°C selama 15 menit.

3.4.8. Pembuatan Media Agar Mueller-Hinton

Agar Mueller-Hinton (Difco) dengan pH $7,3 \pm 0,1$, komposisinya :

Infus daging sapi	300,00 g
Asam kasamino (teknis)	17,50 g
Kanji	1,50 g
Bacto agar	17,00 g

Cara pembuatan :

Sebanyak 38 g bahan dilarutkan dalam 1 liter air suling, kemudian dipanaskan hingga larut sempurna, lalu disterilkan dalam autoklaf 121°C selama 15 menit.

3.4.9. Pembuatan Agar Cetrimide

Agar cetrimide (Merck) dengan pH $7,2 \pm 0,2$, komposisinya :

Pepton dari gelatin	20 g
MgCl_2	1,4 g
K_2SO_4	10 g
N-setil-N,N,N-trimetilammoniumbromida	0,3 g
Agar	13,6 g

Cara pembuatan :

Sebanyak 45,3 gram bahan dilarutkan dalam 1 liter air suling, panaskan hingga larut sempurna. Sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C .

3.4.10. Pembuatan Biakan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

3.4.10.1. Pembuatan Daerah Kerja Aseptis

Siapkan 1 buah bunsen dalam *biosafety cabinet* (BSC) *laminar air flow* (LAF) kemudian nyalakan bunsen selama 10 menit hingga mendapatkan nyala api berwarna biru, kemudian siapkan alat-alat yang diperlukan, seperti rak tabung reaksi bersama tabung sterilnya di sekitar daerah aseptis.

3.4.10.2. Pembuatan Agar Miring

- Buka kapas penyumbat tabung reaksi, bakar bibir tabung.

- Buat agar miring dengan menuang ± 5 mL media agar cetrimide cair ke dalam tabung reaksi steril yang masing – masing telah diberi nama sesuai nama jenis bakteri.
- Bakar kembali bibir tabung. Sumbat kembali tabung dengan kapak lalu letakkan miring pada papan pembentuk agar miring dan biarkan memadat.
- Semua pekerjaan di atas dilakukan dengan memperhatikan prosedur kerja aseptis.

3.4.10.3. Teknik Inokulasi pada Agar Miring

- Ambil isolat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
- Inokulasi dengan jarum ose
 - a) Bakar jarum ose dari bagian pangkal dalam terus hingga ke bagian lup (ujung) sampai berpijar merah.
 - b) Biarkan selama beberapa detik sampai ose menjadi dingin, kemudian segera ambil tabung reaksi yang berisi kultur bakteri, buka penutupnya dengan ketiga jari tengah, manis dan kelingking sedangkan jari telunjuk dan ibu jari memegang jarum ose.
 - c) Bakar bibir tabung reaksi dengan cara memutar tabung sehingga semua bagian bibir tabung terkena api.
 - d) Segera masukkan jarum ose ke dalam tabung reaksi, lalu segera keluarkan. Usahakan ketika memasukkan jarum ose jangan sampai menyentuh dinding tabung dan lakukan di dekat pembakar bunsen.
 - e) Bakar kembali bibir tabung reaksi dan segera tutup. Ingat, jarum ose jangan dibakar kembali karena akan membunuh bakteri yang akan diinokulasikan.
 - f) Ambil tabung reaksi lainnya yang akan diinokulasi, buka tutupnya dengan cara yang sama dengan cara (b) dan bakar bibirnya dengan cara yang sama dengan cara (c)
 - g) Segera masukkan jarum ose ke dalam tabung tadi sebagaimana cara (d).
 - h) Bakar bibir tabung reaksi dan tutup sebagaimana cara (c).
 - i) Bakar kembali jarum ose sebagaimana cara (a).

- Inokulasikan biakan bakteri pada agar miring yang masing – masing telah di beri nama jenis bakteri menggunakan jarum ose ujung bulat dengan cara menggoreskan pada media agar miring (jarum ose di *flambeer* dahulu sebelum dan sesudah mengambil bakteri untuk diinokulasikan ke media).
- Inkubasikan semua media yang telah diinokulasikan ke dalam inkubator 37°C selama 18-24 jam.

3.4.11. Identifikasi Bakteri

Pertama identifikasi bakteri dilakukan dengan teknik pewarnaan Gram. Suspensi bakteri diambil sebanyak 1 sampai 2 sengkeli, diletakkan di atas kaca objek, kemudian disebar setipis mungkin membentuk lingkaran dengan diameter 1 cm dan difiksasi dengan melewatkannya di atas api. Larutan karbol kristal ungu sebanyak ditambahkan hingga melapisi seluruh preparat dan dibiarkan selama 5 menit, kemudian dicuci dengan air. Ditetaskan larutan lugol hingga melapisi seluruh preparat, biarkan selama 1 menit, cuci dan bilas dengan alkohol 96% selama 30 detik. Cuci kembali dengan air. Larutan air fukhsin ditetaskan hingga melapisi seluruh preparat kemudian dibiarkan selama 1-2 menit, cuci dengan air dan dibiarkan mengering. Tetesi minyak immersi di atas preparat. Bentuk dan warna sel bakteri dalam preparat diamati dengan menggunakan mikroskop.

Kedua, pengamatan makroskopik koloni pada media cetrimide. Pengamatan dilakukan terhadap warna koloni bakteri setelah bakteri diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Untuk pengamatan resistensi dilakukan dengan menggunakan metode cakram. Pada cawan petri I *seed layer* ditanamkan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan pada *seed layer* cawan petri II ditanamkan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*. Kemudian, ke dalam setiap cawan petri ditambahkan sebuah cakram kertas kosong dan sebuah cakram kertas yang telah ditetesi larutan gentamisin sulfat. Setiap cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, dilakukan pengamatan terhadap zona hambat yang terdapat pada setiap cakram kertas.

3.4.12. Pembuatan Media Kaldu Mueller-Hinton

Media kaldu Mueller-Hinton (Oxoid) dengan pH $7,3 \pm 0,1$, komposisi :

Infusa daging	300 g
Kasein hidrolisat	17,5 g
Pati	1,5 g

Cara pembuatan :

Sebanyak 21,0 gram bahan dilarutkan dalam 1 liter air suling dan dipanaskan hingga larut sempurna. Sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit suhu 121°C .

3.4.13. Uji Aktivitas Antibakteri

3.4.13.1. Pembuatan Inokulum Bakteri (Lorian, 1980)

Biakan bakteri yang telah berumur 24 jam pada agar miring diambil beberapa sengkeliit dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10,0 mL *aquabidest* hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar McFarland III (10^9 CFU/mL) kemudian dilakukan pengenceran hingga diperoleh konsentrasi 5×10^5 CFU/mL.

3.4.13.2. Pembuatan Larutan Uji

Larutan stok gentamisin sulfat dan suspensi gentamisin sulfat terenkapsulasi liposom dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95; 0,98 ppm dalam kaldu Mueller-Hinton.

3.4.13.3. Penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) terhadap Bakteri (Pelczar, 1986; Mueller, 1978)

Pada penelitian ini pengukuran KHM dilakukan dengan menggunakan metode dilusi cair dengan kelompok uji sebagai berikut:

1. Kelompok uji A : Larutan gentamisin sulfat dengan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
2. Kelompok uji B : Suspensi liposom gentamisin sulfat dengan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
3. Kelompok uji C : Larutan gentamisin sulfat dengan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*.

4. Kelompok uji D : Suspensi liposom gentamisin sulfat dengan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*.

Ke dalam tabung reaksi volume 10 mL yang telah berisi 0,5 mL seri pengenceran sampel (larutan stok gentamisin sulfat dan liposom gentamisin sulfat) masing-masing ditambahkan 0,1 mL inokulum bakteri 10^6 CFU/mL. *Vortex* campuran tersebut hingga homogen dan inkubasi pada suhu 28-30°C selama 18-24 jam. Setelah 18-24 jam dilakukan pengamatan hasil berupa KHM yaitu konsentrasi terendah sampel dimana tidak terdapat lagi pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan jernihnya larutan.

Untuk penentuan KBM, lempeng agar ceftrimide yang telah membeku dan dibiarkan semalaman pada suhu ruang kemudian diinokulasikan dengan sampel hasil uji KHM sebanyak dua sengkeli dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28-30°C. Pada penentuan KHM dan KBM ini digunakan 5 kontrol yaitu :

1. Kontrol A adalah kontrol bakteri, terdiri dari 0,9 mL kaldu Mueller-Hinton yang diinokulasi dengan 0,1 mL inokulum bakteri, tanpa larutan uji.
2. Kontrol B adalah kontrol larutan stok gentamisin sulfat, terdiri dari 0,9 mL kaldu Mueller-Hinton dan 0,1 mL larutan uji, tanpa inokulum bakteri.
3. Kontrol C adalah kontrol liposom terdiri dari 0,8 mL kaldu Mueller-Hinton, 0,1 mL suspensi liposom kosong, dan 0,1 mL inokulum bakteri.
4. Kontrol D adalah kontrol gentamisin sulfat terenkapsulasi liposom, terdiri dari 0,9 mL kaldu Mueller-Hinton dan 0,1 mL suspensi liposom gentamisin sulfat, tanpa inokulum bakteri.
5. Kontrol E adalah kontrol media, terdiri dari 1,0 mL kaldu Mueller-Hinton tanpa inokulum bakteri.

Hasil berupa KBM ditentukan dengan pengamatan pada konsentrasi terendah dimana sudah tidak ada lagi pertumbuhan koloni bakteri pada plat agar ceftrimide.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pembuatan Liposom

Formula liposom yang digunakan pada pembuatan suspensi liposom dapat dilihat pada Tabel 3.1. Fosfatidilkolin kuning telur dan kolesterol pada setiap formula tersebut dilarutkan secara aseptis (dalam *laminar air flow*) dalam 10 mL kloroform pro analis. Setelah fosfolipid dan kolesterol larut sempurna, campuran tersebut kemudian dievaporasi menggunakan *vacuum rotary evaporator* guna menghasilkan lapisan tipis.

Pada pembuatan lapis tipis liposom terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan untuk mendapatkan kondisi optimum pembuatan lapis tipis liposom. Melalui uji pendahuluan didapatkan kondisi optimum pembuatan liposom yaitu pada suhu 60°C dan kecepatan bervariasi yaitu antara 50-120 rpm serta diselingi dengan sesekali menyalakan pompa vakum evaporator. Kecepatan yang bervariasi ditujukan untuk menghasilkan lapis tipis yang merata pada labu evaporator. Semakin tinggi kecepatan *vacuum rotary evaporator* maka semakin tinggi pula posisi lapis tipis yang terbentuk pada labu *vacuum rotary evaporator*. Pertama diawali dengan kecepatan terendah yaitu 50 rpm untuk membentuk lapisan tipis pada bagian terbawah labu evaporator. Setelah 10 menit, pompa vakum evaporator dinyalakan selama 15 detik untuk membantu penguapan kloroform. Setelah pompa vakum dimatikan, evaporator tetap dibiarkan pada kondisi kecepatan 50 rpm selama 5 menit. Berikutnya, kecepatan *rotary evaporator* dirubah menjadi 70, 90, dan 120 rpm. Setiap kecepatan tersebut berlangsung selama 15 menit. Sebelum perpindahan ke kecepatan berikutnya pompa vakum dinyalakan selama 15 detik dan setelah pompa vakum dimatikan kecepatan *vacuum rotary evaporator* dibiarkan sama terlebih dahulu selama 5 menit sebelum berpindah ke kecepatan berikutnya.

Setelah terbentuk lapis tipis yang merata pada labu evaporator lapis tipis yang terbentuk pada labu evaporator dialiri dengan gas N₂. Prosedur ini ditujukan untuk menghilangkan sisa kloroform yang masih terdapat pada lapis tipis serta untuk menghilangkan oksigen yang ada guna mencegah oksidasi.

Untuk memastikan bahwa sisa kloroform sudah hilang sempurna, lapis tipis yang sudah dialiri gas N₂ dibiarkan semalaman dalam lemari pendingin. Setelah dibiarkan semalaman, lapis tipis memasuki proses hidrasi.

Untuk formula I, lapis tipis dihidrasi dengan 30 mL dapar fosfat steril pH 7,4 dan untuk formula II lapis tipis dihidrasi dengan 30 mL dapar fosfat steril pH 7,4 yang telah mengandung 300 mg gentamisin sulfat (konsentrasi 10 mg/mL). Proses hidrasi dilakukan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 60°C dan kecepatan 60 rpm selama 60 menit sampai seluruh lapis tipis luruh dan terbentuk suspensi liposom. Pada proses hidrasi digunakan *glass beads* untuk membantu peluruhan lapis tipis yang menempel pada labu evaporator. Setelah proses hidrasi selesai, suspensi liposom dipindahkan secara aseptis ke dalam vial 50 mL dan di-*vortex* selama 15 menit. Suspensi liposom di-*vortex* selama 15 menit dengan tujuan untuk homogenisasi suspensi liposom. Suspensi liposom akhir yang terbentuk ialah suspensi berwarna putih untuk liposom kosong dan putih kekuningan untuk liposom gentamisin sulfat. Perbedaan warna suspensi liposom ini dipengaruhi oleh ukuran globul liposom yang diketahui melalui pengukuran distribusi ukuran partikel. Gambar suspensi liposom dapat dilihat pada Gambar 4.1.

4.2. Evaluasi Liposom

4.2.1. Morfologi Liposom

Pertama dilakukan pemeriksaan morfologi liposom menggunakan mikroskop konvokal. Namun, globul liposom tidak dapat terdeteksi oleh mikroskop konvokal oleh karena keterbatasan alat mikroskop konvokal. Batas minimum deteksi mikroskop konvokal adalah 6 µm. Melalui hasil tersebut, disimpulkan bahwa dibutuhkan alat analisis dengan batas minimum deteksi lebih kecil dikarenakan ukuran globul liposom yang > 6µm. Oleh karena itu, peneliti mencoba menggunakan *scanning electron microscopy* (SEM) yang mempunyai batas minimum deteksi sampai dengan 200 nm. Namun, ditemukan kendala lain yaitu *scanning electron microscopy* (SEM) biasa digunakan untuk sampel kering sedangkan suspensi liposom adalah sampel basah. Melalui penelitian terdahulu (Saputra, 2011), kendala ini dapat diatasi dengan penggunaan *carbon conductivity tape* untuk mengeringkan suspensi liposom.

Sebanyak 10 μL suspensi liposom ditetaskan pada *carbon conductivity tape* dan disimpan pada desikator selama 4 hari untuk mengeringkan sampel pada *carbon conductivity tape*. Setelah sampel kering, sampel pada *carbon conductivity tape* diperiksa menggunakan *scanning electron microscopy* (SEM). Namun, melalui hasil pemeriksaan menggunakan *scanning electron microscopy* belum didapatkan pencitraan globul liposom yang jelas. Hal ini dikarenakan kurangnya konduktivitas sampel. Untuk mengatasi hal tersebut, sampel pada *carbon conductivity tape* di-coating menggunakan alat *sputter coating-SEM* yang dapat menyemprotkan logam *coating* dalam keadaan vakum. Dalam proses *coating* digunakan campuran logam Paladium (Pd) dan Aurum (Au). Sampel di *coating* di dalam alat *sputter coating* selama 3 menit dan digunakan tegangan sebesar 12 V untuk melapisi globul-globul liposom yang terdapat pada *carbon conductivity tape* agar dapat memberikan pencitraan yang lebih baik pada alat SEM dengan meningkatnya konduktivitas.

Setelah proses *coating* didapatkan penampakan globul liposom berupa bentuk bola sferis untuk liposom kosong dan bulatan seperti bercak untuk liposom gentamisin sulfat. Gambar pemeriksaan morfologi liposom dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan Gambar 4.3. Tidak sempurnanya hasil pemeriksaan morfologi liposom gentamisin sulfat diperkirakan disebabkan oleh rusaknya globul liposom pada saat proses pengeringan dan proses *coating* sehingga pencitraan yang didapat tidak seperti pada pencitraan globul liposom kosong yang berbentuk bola namun bercak bulatan datar. Namun, bercak yang berbentuk bulat sudah dapat membuktikan bahwa terbentuk globul pada suspensi liposom gentamisin sulfat yang berbentuk bulat.

4.2.2. Pengukuran Distribusi Ukuran Partikel

Untuk mengetahui distribusi ukuran partikel suspensi liposom digunakan alat *particle size analyzer* (PSA). Hasil dapat dilihat pada Lampiran 4.1 dan Lampiran 4.2. Melalui hasil analisis diketahui bahwa ukuran globul suspensi liposom kosong adalah 288,9 nm dan ukuran globul suspensi liposom gentamisin sulfat adalah 377,9 nm. Melalui hasil pengukuran distribusi ukuran partikel globul liposom dan identifikasi warna suspensi liposom dapat ditarik kesimpulan bahwa ukuran globul liposom memengaruhi warna suspensi liposom yang terbentuk.

Semakin besar ukuran globul liposom maka akan semakin pekat warna suspensi liposom yang terbentuk.

4.2.3. Penentuan Efisiensi Penjerapan Liposom

Prosedur penentuan efisiensi penjerapan liposom hanya dilakukan pada suspensi liposom formula II (suspensi liposom gentamisin sulfat). Terlebih dahulu dilakukan proses pemisahan gentamisin sulfat yang tidak terjerap oleh liposom dan gentamisin sulfat yang terjerap liposom. Pertama, dilakukan proses pemisahan dengan menggunakan penyaring bunchner dengan membran filter 0,45 μm . Proses ini tidak dapat digunakan untuk memisahkan gentamisin sulfat yang tidak terjerap oleh liposom dengan gentamisin sulfat yang terjerap oleh liposom karena globul liposom dapat melewati membran filter tersebut. Untuk mengatasi kendala tersebut, digunakan membran filter 0,2 μm . Dengan menggunakan membran filter 0,2 μm didapatkan *supernatant* yang jernih akan tetapi ditemukan kendala lainnya. Globul-globul liposom yang tertinggal pada membran filter tidak dapat diresuspensikan kembali dengan sempurna. Globul-globul liposom yang didapatkan dari hasil pemisahan harus dapat diresuspensikan kembali agar didapatkan suspensi liposom murni karena suspensi liposom murni yang didapatkan kelak dibutuhkan untuk uji aktivitas antibakteri.

Berikutnya dilakukan percobaan terhadap metode dialisis. Metode dialisis menjadi alternatif yang baik karena suspensi liposom dapat diresuspensikan kembali dan dapat digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri. Namun, pada metode dialisis juga ditemukan kendala. Proses dialisis memerlukan waktu yang panjang (24 jam).

Sebagai pemecahan masalah tersebut, dilakukan percobaan terhadap metode sentrifugasi. Metode ini menggunakan alat ultrasentrifugasi dengan kecepatan 50.000 g x 30 menit x 3. Sebanyak 5 mL suspensi liposom dimasukkan dalam *tube* menggunakan *syringe*. *Tube* tersebut kemudian disegel dan dipasangkan pada alat ultrasentrifugasi sehingga tercipta keadaan vakum pada *tube* tersebut. Alat ultrasentrifugasi dijalankan dengan kecepatan 50.000 g selama 30 menit. Setelah itu, didapatkan 2 lapisan dalam *tube* yaitu lapisan jernih (*supernatant*) dan endapan globul liposom dimana pada *supernatant* terdapat gentamisin sulfat yang tidak terekapsulasi liposom yang dibutuhkan untuk

penentuan efisiensi penjerapan liposom. Untuk memisahkan *supernatant* dan endapan globul liposom, terlebih dahulu segel *tube* dirusak dan *supernatant* diambil menggunakan *syringe* dan dimasukkan dalam vial. Endapan liposom yang tertinggal dalam *tube* dirusespensikan kembali menggunakan dapar fosfat steril pH 7,4 dicukupkan hingga 5 mL. Kemudian suspensi liposom hasil resuspensi tersebut dipindahkan ke dalam *tube* yang lain menggunakan *syringe*, disegel kembali, dan kembali dipasang pada alat ultrasentrifugasi. Alat ultrasentrifugasi kembali dijalankan selama 30 menit dengan kecepatan 50.000 g. Proses ini dilakukan sampai 3 kali seperti pada diagram alur Lampiran 3.2. sehingga didapati suspensi liposom murni dan 3 *supernatant*.

Ketiga *supernatant* tersebut digunakan untuk penentuan efisiensi penjerapan liposom secara mikrobiologi dengan menggunakan metode cakram. Untuk *base layer* digunakan agar nutrisi dan untuk *seed layer* digunakan agar Mueller-Hinton. Agar nutrisi digunakan sebagai *base layer* karena agar nutrisi cocok untuk kemudahan pengamatan hasil dan perkembangan bakteri yang digunakan yaitu *Pseudomonas aeruginosa*. Jika digunakan agar spesifik lainnya, sebagai contoh agar cetrimide, hal ini dapat mengganggu pengamatan hasil karena kuman *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan pigmen piosianin yang berwarna hijau. Untuk *seed layer* digunakan agar Mueller-Hinton karena agar Mueller-Hinton sensitif dan selektif untuk pengujian antibiotik.

Sebagai standar digunakan larutan gentamisin sulfat dalam dapar fosfat steril pH 7,4 dengan berbagai konsentrasi yaitu 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,63 ppm. Sebanyak 50 mg gentamisin sulfat dimasukkan dalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan serta dicukupkan hingga batas menggunakan dapar fosfat steril pH 7,4. Setelah larut sempurna, sebanyak 5 mL larutan gentamisin sulfat diambil menggunakan *syringe* steril dan disaring melalui filter bakteri yang sudah disterilkan terlebih dahulu dengan demikian didapatkan larutan stok gentamisin sulfat steril dengan konsentrasi 1.000 ppm. Berikutnya, larutan tersebut digunakan untuk melakukan pengenceran dalam tabung dengan metode Kirby-Bauer sehingga didapatkan larutan gentamisin sulfat dengan berbagai konsentrasi yaitu 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,63 ppm. Zona hambat yang dihasilkan oleh setiap konsentrasi larutan gentamisin sulfat akan digunakan untuk

menghasilkan persamaan kurva kalibrasi dengan menghubungkan konsentrasi larutan dengan zona hambat yang terbentuk. Kurva kalibrasi tersebut kemudian dapat digunakan untuk menghitung jumlah gentamisin sulfat yang terdapat pada *supernatant* dengan memasukkan zona hambat yang dibentuk oleh *supernatant* ke dalam persamaan kurva kalibrasi. Sebelum diteteskan pada cakram kertas, *supernatant* terlebih dahulu disaring melalui filter bakteri yang sudah steril untuk memastikan bahwa larutan *supernatant* sudah steril sehingga tidak akan mengganggu pengamatan hasil.

Pada tahap penentuan efisiensi penjerapan liposom terlebih dahulu dilakukan optimasi inokulum dan volume sampel yang akan diteteskan pada cakram kertas. Setiap percobaan dilakukan duplo. Pada inokulum 10^9 CFU/mL *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan volume sampel 10 μ L, didapatkan hasil bahwa zona hambat yang terdeteksi hanya zona hambat dari larutan gentamisin sulfat dengan konsentrasi 1.000; 500; dan 250 ppm sedangkan untuk ketiga sampel *supernatant* hasil ultrasentrifugasi serta larutan gentamisin sulfat dengan konsentrasi 125; 62,5; 31,25; dan 15,63 ppm tidak didapati zona hambat. Pada inokulum 10^9 CFU/mL *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan volume sampel 20 μ L, didapatkan hasil bahwa zona hambat yang terdeteksi hanya zona hambat dari larutan gentamisin sulfat dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 61,5; 31,25 ppm sedangkan untuk ketiga sampel *supernatant* hasil ultrasentrifugasi serta larutan gentamisin sulfat dengan konsentrasi 15,63 ppm tidak didapati zona hambat. Penggunaan inokulum 10^6 CFU/mL dan volume sampel 10 μ L didapatkan hasil bahwa zona hambat yang terdeteksi hanya zona hambat dari larutan gentamisin sulfat dengan konsentrasi 1.000; 500; 250; 125; dan 62,5 ppm sedangkan untuk ketiga sampel *supernatant* hasil ultrasentrifugasi serta larutan gentamisin sulfat dengan konsentrasi 31,25 dan 15,63 ppm tidak didapati zona hambat. Inokulum 10^6 CFU/mL dan volume sampel 20 μ L menghasilkan zona hambat pada larutan gentamisin sulfat dengan konsentrasi 1.000; 500; 250; 125; 62,5; dan 31,25 ppm sedangkan untuk ketiga sampel *supernatant* hasil ultrasentrifugasi serta larutan gentamisin sulfat dengan konsentrasi 15,63 ppm tidak didapati zona hambat. Saat inokulum 10^5 CFU/mL dan volume sampel 10 μ L digunakan, didapatkan hasil bahwa zona hambat yang

terdeteksi hanya zona hambat dari larutan gentamisin sulfat dengan konsentrasi 1.000; 500; 250; 125; 62,5; dan 31,25 ppm sedangkan untuk ketiga sampel *supernatant* hasil ultrasentrifugasi serta larutan stok gentamisin sulfat dengan konsentrasi 15,63 ppm tidak didapati zona hambat.

Larutan stok gentamisin sulfat dengan konsentrasi 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,63 ppm dapat menghasilkan zona hambat dengan penggunaan inokulum 10^5 CFU/mL dan volume sampel 20 μ L. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 4.5 dan Gambar 4.6 serta hasil pengukuran zona hambat dapat dilihat pada Tabel 4.2. Untuk kurva kalibrasi yang didapat dari hasil hubungan konsentrasi larutan gentamisin sulfat dan zona hambat yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 4.7 dan Gambar 4.8. Namun, untuk ketiga *supernatant* hasil ultrasentrifugasi yang sudah disaring menggunakan filter bakteri steril didapati hasil yang berbeda. Tidak seperti zona hambat pada larutan gentamisin sulfat yang merupakan zona bersih (jernih), untuk ketiga *supernatant* hasil ultrasentrifugasi didapati penebalan yang sangat jelas dengan bentuk bervariasi dari lingkaran sampai dengan tidak beraturan. Untuk itu peneliti melakukan identifikasi lanjutan untuk mengetahui penyebab penebalan tersebut.

Peneliti mengambil sampel dari setiap cawan dari penebalan tersebut menggunakan ose. Sampel dari setiap cawan digoreskan pada 2 cawan petri berisi agar nutrisi dan 2 cawan petri berisi agar cetrimide. Setiap sampel dari cawan petri, 1 cawan petri berisi agar nutrisi dan 1 cawan petri berisi agar cetrimide diinkubasi pada suhu 37°C serta 1 cawan petri berisi agar nutrisi dan 1 cawan petri berisi agar cetrimide diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Didapatkan hasil pada cetrimide agar terdapat pigmen hijau yang merupakan ciri spesifik dari *Pseudomonas aeruginosa* pada media agar cetrimide. Dengan demikian, penebalan pada cakram ketiga hasil ultrasentrifugasi tersebut bukanlah zona hambat melainkan penebalan pertumbuhan bakteri.

Tidak dihasilkan zona hambat pada sampel ketiga *supernatant*. Namun, tidak dapat dinyatakan bahwa efisiensi penjerapan liposom adalah utuh 100% karena konsentrasi terkecil yang dapat terdeteksi pada uji metode cakram adalah 15,63 ppm. Maka dari itu, efisiensi penjerapan liposom disimpulkan mendekati 100% dikarenakan konsentrasi awal gentamisin sulfat adalah 10.000 ppm (10

mg/mL) dan gentamisin sulfat yang terdeteksi dalam *supernatant* hasil ultrasentrifugasi (gentamisin sulfat yang tidak terperap liposom) adalah <15,63 ppm, dimana :

$$\frac{10.000 \text{ ppm} - 15,63 \text{ ppm}}{10.000 \text{ ppm}} \times 100\% = 99,8437\% \approx 100\%$$

sehingga untuk konsentrasi dari suspensi liposom murni disimpulkan mengandung gentamisin sulfat 10.000 ppm dan pada pengujian aktivitas antibakteri aktivitas dari suspensi liposom gentamisin sulfat akan dibandingkan dengan larutan gentamisin sulfat konsentrasi 10.000 ppm.

4.3. Uji Sterilitas

Setiap komponen yang digunakan dalam pengujian mikrobiologi diupayakan sedapat mungkin steril agar tidak mengganggu pengamatan hasil akhir dari pengujian mikrobiologi. Uji sterilitas dilakukan pada media yang dipakai yaitu agar Mueller-Hinton, kaldu Mueller-Hinton, agar nutrisi, dan agar cetrimide serta pada cakram kertas, larutan stok gentamisin sulfat, suspensi liposom kosong, dan suspensi liposom gentamisin sulfat. Prosedur dari pengujian ini adalah untuk larutan stok gentamisin sulfat, suspensi liposom kosong dan suspensi liposom gentamisin sulfat. Terlebih dahulu ke dalam tabung reaksi 20 mL dimasukkan 9 mL medium tioglikolat cair. Setelah itu, dimasukkan 1 mL sampel ke dalam tabung reaksi tersebut. Untuk cakram kertas, terlebih dahulu dimasukkan 10 mL media tioglikolat cair ke dalam tabung reaksi 20 mL dan setelah itu dimasukkan cakram kertas yang akan diuji sterilitasnya menggunakan pinset yang disterilkan dengan menggunakan alkohol 70% dan di-*flambeer*. Digunakan juga tabung reaksi yang hanya berisi 10 mL media tioglikolat saja sebagai kontrol media. Setiap sampel dan kontrol diuji secara triplo. Setelah preparasi selesai, tabung-tabung reaksi yang telah terisi sampel dan kontrol diinkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari.

Untuk pengujian sterilitas media dilakukan dengan cara membiarkan media tersebut semalaman pada suhu ruang sebelum digunakan dalam pengujian mikrobiologi. Jika didapati pada media tersebut tumbuh kontaminan, maka media tersebut tidak dapat dipakai untuk pengujian.

Setelah 7 hari, dilakukan pengamatan terhadap sampel cakram kertas, larutan gentamisin sulfat, suspensi liposom kosong, dan suspensi liposom gentamisin sulfat. Hasil dapat dilihat pada Gambar 4.4 dan Tabel 4.1.

Cakram kertas dan larutan stok gentamisin sulfat memberikan hasil positif (steril) karena kedua bahan tersebut mendapatkan perlakuan sterilisasi akhir terlebih dahulu sebelum pengujian sterilitas. Cakram kertas disterilisasi menggunakan autoklaf dan larutan gentamisin sulfat melalui proses filtrasi menggunakan filter bakteri yang sudah disterilisasi terlebih dahulu. Walau proses pembuatan suspensi liposom kosong dan suspensi liposom gentamisin sulfat sudah diupayakan dalam kondisi aseptis, namun hasil pengujian sterilitas menyatakan bahwa suspensi liposom kosong dan suspensi liposom gentamisin sulfat tidak steril. Kemungkinan karena tidak stabilnya gentamisin sulfat selama pengujian dapat dieliminasi karena menurut penelusuran literatur gentamisin sulfat stabil dalam larutan dalam kurun waktu 1 minggu dan hal tersebut juga terbukti melalui uji sterilitas dengan sampel larutan gentamisin sulfat yang memberikan hasil akhir steril. Sehingga dapat disimpulkan bahwa hal tersebut dikarenakan tidak sterilnya bahan baku liposom yaitu fosfatidilkolin dan kolesterol serta zat aktif gentamisin sulfat. Proses pemurnian suspensi liposom yang tidak dapat dilakukan secara aseptis juga menjadi faktor tidak sterilnya suspensi liposom gentamisin sulfat.

4.4. Identifikasi Bakteri

Uji untuk mengonfirmasi identitas bakteri dilakukan terlebih dahulu sebelum digunakan dalam pengujian. Pertama dilakukan identifikasi melalui pertumbuhan koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada media agar cetrimide. Setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 memberikan warna hijau muda terang pada media agar cetrimide sedangkan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* memberikan warna hijau tua pada media agar cetrimide. Gambar dapat dilihat pada Gambar 4.10. Namun, perbedaan pigmen hanya ditunjukkan jika isolat diinkubasi pada suhu 37°C sedangkan jika isolat diinkubasi pada suhu ruang tidak akan tampak perbedaan antara pigmen yang dihasilkan oleh isolat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*.

Perbedaan pigmen yang dihasilkan dikarenakan perbedaan kekuatan pertumbuhan dari *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini didukung oleh hasil yang didapat bahwa perbedaan pigmen hanya terjadi pada suhu inkubasi 37°C. Pertumbuhan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* maksimal pada suhu optimum pertumbuhan bakteri tersebut yaitu 37°C sedangkan suhu optimum untuk pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 28-30°C. Sehingga pigmen piosianin yang dihasilkan oleh *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* dalam kurun waktu 24 jam pada suhu inkubasi 37°C lebih banyak dibandingkan pigmen piosianin yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hal ini menyebabkan warna hijau yang dihasilkan oleh koloni *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* lebih pekat daripada warna hijau yang dihasilkan oleh koloni *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada media agar ceftrimide jika diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengujian berikutnya adalah melalui zona hambat metode cakram dengan menggunakan larutan gentamisin sulfat. Setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C dilakukan pengamatan terhadap diameter zona hambat dan diidentifikasi. Diketahui bahwa untuk inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 terlihat adanya zona hambat di sekitar cakram larutan gentamisin sulfat sedangkan pada inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* tidak terlihat adanya zona hambat di sekitar cakram larutan gentamisin sulfat. Gambar dapat dilihat pada Gambar 4.11.

Proses identifikasi tahap akhir adalah pewarnaan Gram. Melalui pewarnaan Gram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* terlihat bentuk batang berwarna merah yang menandakan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang. Hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada Gambar 4.9.

Pada tahap pewarnaan gram, preparat bakteri menjadi ungu setelah diberikan karbol kristal ungu karena zat warna karbol kristal ungu diserap sel dan protoplasma bakteri. Setelah itu, pemberian lugol menyebabkan kompleks kristal ungu-yodium terbentuk yang memberikan warna ungu kotor. Pada bakteri Gram

negatif kompleks tersebut akan dilepaskan saat pencucian alkohol sehingga warna yang terikat adalah warna merah karena pemberian larutan Fukhsin.

Reaksi yang terjadi pada bakteri Gram positif akan berbeda karena terdapat perbedaan antara susunan kimia dinding sel antara bakteri Gram positif dan Gram negatif. Perbedaan tersebut ialah bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis, susunan dinding sel yang tidak kompak, dan permeabilitas dinding sel yang lebih besar dari bakteri Gram positif. Selain itu, bakteri Gram negatif memiliki kadar lipid yang lebih tinggi daripada bakteri Gram positif sehingga meskipun kompleks kristal ungu-yodium telah terbentuk, alkohol dapat melarutkan lipid pada dinding sel bakteri Gram negatif dengan meningkatkan permeabilitas sel sehingga menyebabkan hilangnya warna yang terbentuk dari kompleks kristal ungu-yodium.

4.4. Uji Aktivitas Antibakteri

Media yang digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri adalah media kaldu Mueller-Hinton. Sampel yang digunakan adalah larutan gentamisin sulfat dengan konsentrasi 2.000 ppm dan suspensi liposom gentamisin sulfat 10.000 ppm. Terlebih dahulu 1 mL suspensi liposom gentamisin sulfat konsentrasi 10.000 ppm diencerkan dalam 4 mL dapar fosfat steril pH 7,4 sehingga didapatkan konsentrasi akhir suspensi liposom gentamisin sulfat adalah 2.000 ppm. Setiap sampel diberlakukan seri pengenceran dalam 0,5 mL kaldu Mueller-Hinton menurut aturan Kirby-Bauer dengan konsentrasi 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95; dan 0,98 ppm. Setelah itu, pada setiap pengenceran ditambahkan 0,1 mL inokulum bakteri dengan ketentuan kelompok sebagai berikut :

1. Kelompok uji A : Larutan gentamisin sulfat dengan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
2. Kelompok uji B : Suspensi liposom gentamisin sulfat dengan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
3. Kelompok uji C : Larutan gentamisin sulfat dengan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*.
4. Kelompok uji D : Suspensi liposom gentamisin sulfat dengan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*.

Universitas Indonesia

Setiap kelompok uji diujikan secara duplo. Kontrol yang digunakan adalah kontrol media, kontrol kuman, kontrol suspensi liposom gentamisin dan kontrol suspensi liposom kosong. Pada kontrol suspensi liposom kosong juga ditambahkan 0,1 mL inokulum bakteri uji, baik inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835 maupun *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini ditujukan untuk membuktikan bahwa liposom kosong tidak memiliki aktivitas antibakteri.

Pada awal pengujian terlebih dahulu dilakukan optimasi jumlah inokulum, suhu dan waktu inkubasi. Pertama peneliti menggunakan inokulum 10^5 CFU/mL dengan inkubasi 24 jam pada suhu ruang. Didapatkan hasil bahwa KHM untuk larutan gentamisin sulfat bebas dengan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah pada konsentrasi 31,25 ppm dan untuk larutan gentamisin sulfat bebas dengan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* adalah 62,5 ppm sedangkan untuk pengamatan pengujian suspensi liposom gentamisin sulfat menemui kesulitan. Pada saat pengenceran Kirby-Bauer ditemukan bahwa pada pengenceran suspensi liposom gentamisin sulfat dengan konsentrasi 62,5 ppm campuran sudah terlihat jernih sehingga diharapkan dapat dilakukan pengamatan KHM setelah inkubasi. Namun, setelah inkubasi ditemukan bahwa keseluruhan seri pengenceran menjadi keruh. Untuk memastikan apakah hal tersebut terjadi karena suspensi liposom gentamisin sulfat yang tidak steril atau karena tidak terdapatnya KHM (pada seluruh seri pengenceran terjadi pertumbuhan kuman), uji KHM dilanjutkan dengan uji KBM. Uji KBM dilakukan dengan menggoreskan 1-2 ose ke media padat. Pada pengujian kali ini digunakan media agar ceftrimide sebagai media spesifik untuk mendeteksi keberadaan *Pseudomonas aeruginosa*. Untuk kelompok uji dengan sampel larutan stok gentamisin sulfat, hasil dari pengujian KHM yang digoreskan pada media padat ialah seri pengenceran KHM yang memberikan hasil jernih saja dan untuk kelompok uji dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat keseluruhan seri pengenceran KHM digoreskan ke media padat. Hasil pengujian KBM menunjukkan bahwa kelompok uji dengan sampel larutan gentamisin sulfat adalah tidak ada pertumbuhan yang artinya KBM sama dengan KHM dan untuk kelompok uji dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat, KBM untuk kelompok uji

dengan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 1,95 ppm dan untuk kelompok uji dengan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* adalah 3,91 ppm. Terdapat perbedaan yang kurang signifikan antara kelompok uji dengan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan kelompok uji dengan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* sehingga peneliti memutuskan untuk mencoba kondisi optimasi lainnya.

Berikutnya peneliti menggunakan inokulum 10^5 CFU/mL dengan suhu inkubasi 37°C dan waktu inkubasi 24-48 jam. Pengamatan pada saat 24 jam menunjukkan bahwa tidak terdapat KHM pada kelompok uji dengan sampel larutan gentamisin sulfat dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dikarenakan keseluruhan seri pengenceran memberikan hasil akhir larutan jernih dan untuk kelompok uji dengan sampel larutan gentamisin sulfat dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* KHM terdapat pada konsentrasi 1,95 ppm. Sehingga peneliti kembali menginkubasi uji KHM dan melakukan pengamatan ulang setelah inkubasi 48 jam. Namun, tidak terdapat perbedaan hasil setelah inkubasi saat 48 jam. Maka dari itu, peneliti memutuskan untuk mengulang kembali kondisi optimasi yaitu dengan inokulum 10^6 dan inkubasi pada suhu 37°C . Namun, didapatkan hasil yang sama saat pengamatan 24 dan 48 jam dengan kondisi optimasi saat penggunaan inokulum 10^5 CFU/mL, suhu inkubasi 37°C dengan waktu inkubasi 24-48 jam.

Pada percobaan berikutnya peneliti menggunakan inokulum 5×10^5 CFU/mL, suhu inkubasi $28-30^\circ\text{C}$ dan waktu inkubasi 24-48 jam. Pengamatan setelah inkubasi selama 24 jam menunjukkan hasil KHM pada kelompok uji dengan sampel larutan gentamisin sulfat dengan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah pada konsentrasi 15,63 ppm dan untuk kelompok dengan sampel larutan gentamisin sulfat dengan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* adalah pada konsentrasi 62,5 ppm. Hasil dari pengujian tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.12, Gambar 4.13, Gambar 4.16 dan Gambar 4.17 serta pada Tabel 4.3 dan Tabel 4.4. Untuk seri pengenceran liposom suspensi gentamisin sulfat, keadaan yang sama ditemui seperti pada saat optimasi pertama. Setelah inkubasi 24 jam ditemukan bahwa keseluruhan seri pengenceran suspensi liposom gentamisin sulfat yang awalnya jernih dimulai dari konsentrasi 62,5 ppm

menjadi keruh seluruhnya. Gambar hasil pengamatan untuk suspensi liposom dapat dilihat pada Gambar 4.14, Gambar 4.15, Gambar 4.18, dan Gambar 4.19.

Untuk memastikan apakah hal tersebut terjadi karena suspensi liposom gentamisin sulfat yang tidak steril atau karena tidak terdapatnya KHM, uji KHM dilanjutkan dengan uji KBM. Hasil pengujian KBM menunjukkan bahwa keseluruhan hasil uji untuk kelompok uji dengan sampel larutan gentamisin sulfat adalah tidak ada pertumbuhan yang artinya KBM sama dengan KHM. Hasil dari pengamatan kelompok uji dengan sampel larutan gentamisin sulfat dapat dilihat pada Gambar 4.22, Gambar 4.23, Gambar 4.26, dan Gambar 4.27 serta pada Tabel 4.5 dan Tabel 4.7. Untuk kelompok uji dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat, KBM untuk kelompok uji dengan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 7,81 ppm dan untuk kelompok uji dengan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* adalah 3,91 ppm. Pengamatan hasil KBM untuk sampel liposom gentamisin sulfat dapat dilihat pada Gambar 4.24, Gambar 4.25, Gambar 4.28, Gambar 4.29, Gambar 4.30, Gambar 4.31, dan Gambar 4.32 serta pada Tabel 4.6 dan Tabel 4.8. Uji KBM untuk kelompok kontrol inokulum bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, kontrol inokulum bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*, serta kontrol suspensi liposom kosong yang ditambahkan inokulum bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* memberikan hasil positif yaitu terdapat pertumbuhan bakteri (Gambar 4.30, Gambar 4.31, dan Tabel 4.9). Hasil tersebut menandakan bahwa liposom kosong tidak memiliki aktivitas antibakteri baik terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*. Uji KBM pada kontrol suspensi liposom gentamisin sulfat memberikan hasil negatif yang ditandai dengan tidak terdapat pertumbuhan bakteri (Gambar 4.32 dan Tabel 4.9).

Melalui studi pustaka, perbedaan angka KBM antara kelompok uji dengan sampel larutan gentamisin sulfat dengan kelompok uji dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat terjadi dapat terjadi berdasarkan mekanisme fusi. Membran liposom dapat berfusi dengan membran terluar bakteri (Mugabe *et al*, 2006). Data TEM pada penelitian terdahulu menunjukkan bahwa membran

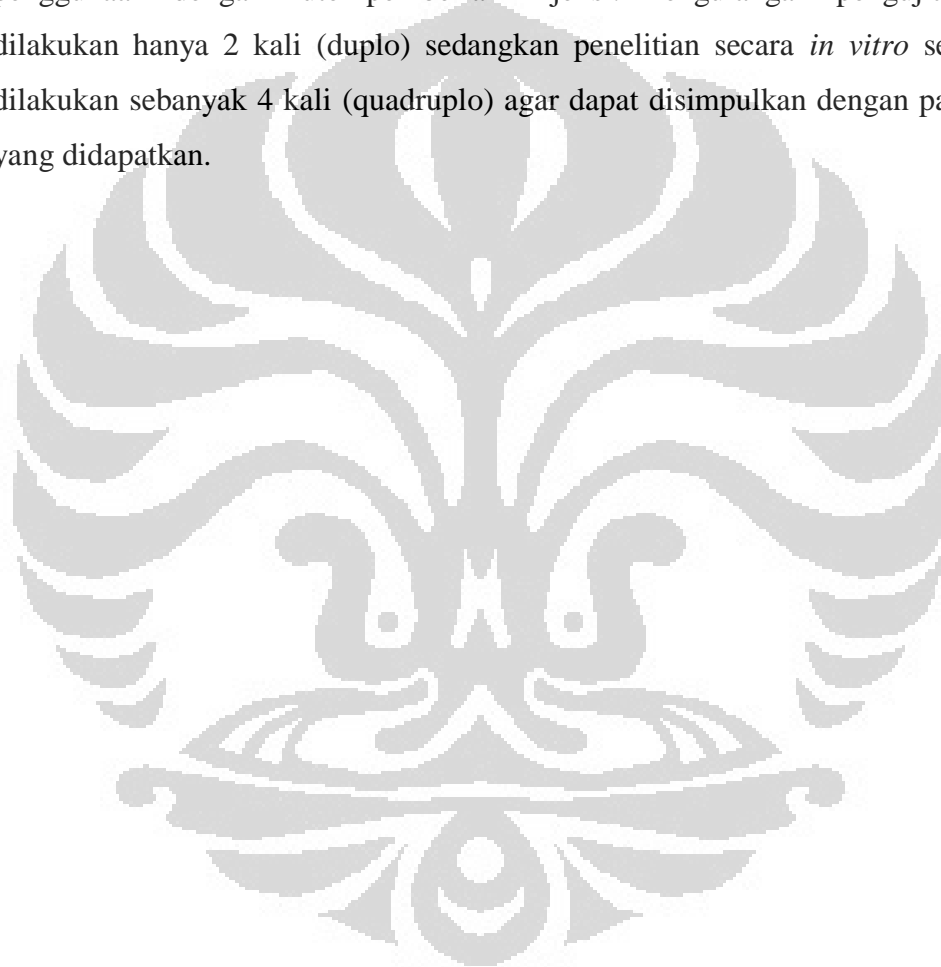
liposom berinteraksi sangat erat dengan membran bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan membran terluar bakteri berdeformasi dan mengembang. Hubungan ini menunjukkan adanya inkorporasi antara fosfolipid liposom dengan membran bakteri karena zat aktif yang pada penelitian ini adalah gentamisin sulfat mengarahkan rantai karbon alifatik kepada membran bakteri diikuti proses disosiasi gentamisin sulfat dari liposom menuju membran bakteri.

Melalui Gambar 4.33. dapat terlihat bahwa baik pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 maupun pada *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* terjadi penurunan konsentrasi bunuh minimum (KBM) jika gentamisin sulfat terenkapsulasi liposom. Sehingga dapat dibuktikan bahwa enkapsulasi liposom dapat meningkatkan aktivitas antibakteri gentamisin sulfat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*.

Untuk hubungan antar strain bakteri baik hasil KHM (Gambar 4.34.) maupun KBM (Gambar 4.33.) menunjukkan bahwa konsentrasi gentamisin sulfat bebas yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan dan membunuh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 lebih rendah daripada konsentrasi gentamisin sulfat yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan dan membunuh bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*. Namun, hasil KBM suspensi liposom gentamisin sulfat menyatakan sebaliknya (Gambar 4.33.). Melalui hasil KBM didapati hasil bahwa konsentrasi gentamisin sulfat terenkapsulasi liposom yang dibutuhkan untuk membunuh *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 lebih besar daripada konsentrasi gentamisin sulfat terenkapsulasi liposom yang dibutuhkan untuk membunuh *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*. Diperkirakan bahwa hal tersebut terjadi karena mekanisme resistensi dari bakteri uji *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* adalah mekanisme overekspresi *efflux pump* sehingga dengan enkapsulasi liposom menjadikan gentamisin sulfat terenkapsulasi liposom sebagai substrat yang cocok untuk P-glikoprotein yang terdapat pada *efflux pump*. Dengan demikian, konsentrasi suspensi liposom gentamisin sulfat yang diperlukan untuk membunuh *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* menjadi lebih kecil

daripada konsentrasi suspensi liposom gentamisin sulfat yang dibutuhkan untuk membunuh *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Pada penelitian ini terdapat kemungkinan adanya bias hasil penelitian diakibatkan keterbatasan dalam hal sterilitas dan kurangnya pengulangan pengujian. Sterilitas diperlukan agar hasil yang didapatkan tidak diganggu oleh faktor-faktor lain yang tidak diketahui seperti kontaminan-kontaminan. Sterilitas juga menjadi hal perlu diupayakan karena sediaan ini kelak dimaksudkan untuk penggunaan dengan rute pemberian injeksi. Pengulangan pengujian yang dilakukan hanya 2 kali (duplo) sedangkan penelitian secara *in vitro* sebaiknya dilakukan sebanyak 4 kali (quadruplo) agar dapat disimpulkan dengan pasti hasil yang didapatkan.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi hambat minimum (KHM) larutan gentamisin sulfat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 15,63 ppm dan terhadap *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* adalah 62,5 ppm. Untuk konsentrasi bunuh minimum (KBM) larutan gentamisin sulfat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 15,63 ppm dan terhadap *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* adalah 62,5 ppm sedangkan konsentrasi bunuh minimum suspensi liposom gentamisin sulfat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 7,81 ppm dan terhadap *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* adalah 3,91 ppm. Berdasarkan hasil uji *in vitro* tersebut dapat ditarik kesimpulan bahwa enkapsulasi liposom dapat meningkatkan aktivitas antibakteri gentamisin sulfat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*.

5.2. Saran

Dengan berbagai kekurangan maupun kelebihan dari penelitian ini, diharapkan di masa yang akan datang dapat dilakukan penelitian-penelitian lanjutan dengan saran sebagai berikut :

1. Perlu diupayakan proses sterilisasi untuk suspensi liposom agar dapat dilakukan pengamatan pada uji KHM.
2. Penelitian yang memiliki fokus pada mekanisme peningkatan aktivitas dari liposom yang mengandung gentamisin sulfat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Menggunakan bakteri uji lain.
4. Menggunakan bakteri uji *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* dengan mekanisme resistensi yang berbeda-beda.
5. Mengadakan pengujian secara *in vivo*.
6. Pengujian KHM dan KBM dilakukan secara quadruplo.

DAFTAR PUSTAKA

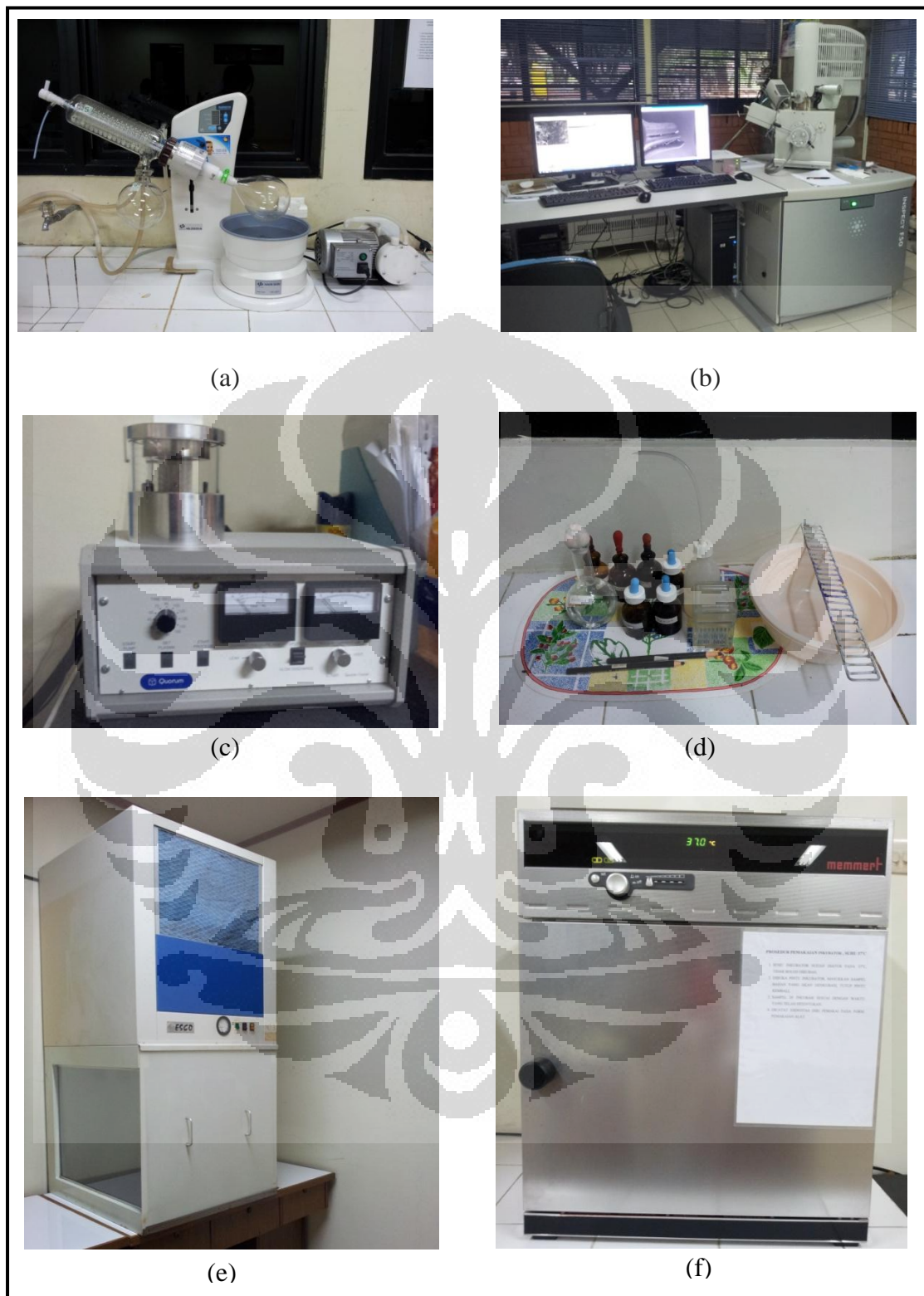
- Alipor, M., Suntres, Z.E., Halwani, M., Azghani, A.O., dan Omri, A. (2009). Activity and Interactions of Liposomal Antibiotics in Presence of Polyanions and Sputum of Patients with Cystic Fibrosis. *PLoS ONE* 4(5), e5724.
- American Pharmaceutical Association. (1994). *Handbook of Pharmaceutical Excipients (2nd ed.)*. London: Pharmaceutical press, 267-268
- American Pharmaceutical Association. (2000). *Handbook of Pharmaceutical Excipients (3rd ed.)*.(hal. 292-293). London: Pharmaceutical press.
- Anonim. (1988). *Culture Media Handbook*. E. Merck, 123-160.
- Anonim. (1994). *Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals*. National Institutes of Health, 151-154.
- Boyd, R. F., dan Marr, J. J. (1980). *Medical Microbiology (1st ed.)*. (hal. 370-371). United States of America: Little, Brown & Company.
- Breidenstein, E.B.M., de la Fuente-Núñez, C. dan Hancock, R.E.W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance*. *Trends in Microbiology* 19(8), 419-426.
- Bryan, A. H., Bryan, C. A., dan Bryan, C. G. (1962). *Bacteriologi Principles and Practice*. New York : Barnes and Noble, 26-29, 189-190.
- Bull, A. T. (2004). *Microbial Diversity and Bioprospecting*. United States of America: ASM Press.
- Chattopadhyay, I., *et al.* Tumeric and Curcumin: Biological Actions and Medicinal Applications. *Current Science* (Vol. 87, no.1) , diunduh 10 Januari 2012.
- Farnsworth, N. R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *J. Pharm. Sci*, 243-268.
- Ganiswara, S. G., *et al.* (1995). *Farmakologi dan Terapi (Ed. ke-4)*.(hal. 571-573). Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Gupte, S. (1990). *Mikrobiologi Dasar (Ed. ke-3)*. (hal. 50-55, 242, 262). Jakarta: Binarupa Aksara..
- Hendricks, O., Butterworth, T. S., dan Kristiansen, J. E. (2003). The In-Vitro Antimicrobial Effect of Non-antibiotics and Putative Inhibitors of Efflux

- Pumps on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22, 262-264.
- Idris I. dan Dalima, A.W. (1993). Dasar Kerja Antimikroba Pada Kuman. *Medika Jurnal Kedokteran dan Farmasi* 19(7); 40-49.
- Jawetz, E., Malnick, J., dan Adelberg, E. (1989). *Review of Medical Microbiology. Lange Medical Book*. (18th Ed). USA: Prentice-Hall International. 40-45, 143-161, 214-217.
- Jia, Y., Hélène, J., dan Abdelwahab, O. (2008). Liposomes as a carrier for gentamicin delivery: Development and evaluation of the physicochemical properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 254-263.
- Koolman, J. dan Roehm, K. H. (2005). *Color atlas of biochemistry*. (2nd ed.). New York: Thieme.
- Lasic, D. D. (1995) Mechanism of Liposome Formation. *Journal of Liposome Research* 5, 431-441.
- Lorian, V. (1980). *Antibiotics in Laboratory Medicine* (2nd Ed.). (hal. 1-179, 510-5). London: Williams and Wilkins.
- Mayesm, P. A., et al. (2003). Biokimia Harper (25th Ed.). *Sintesis, Pengangkutan, dan Ekskresi Kolesterol*. Jakarta: EGC, 270.
- McEvoy, G.K. (Ed.), Miller, J.(Ed.), dan Litvak, K (Ed.). (2005). *AHFS Drug Information* (1st ed.). Bethesda, MD: American Society of Health System Pharmacist.
- Mueller, K. W. (1978). *Laboratory Procedures in Mycology*. Illinois: Hospital Physician Consulting Service. 86, 128-135.
- Mugabe, C., Azghani, A.O., dan Omri, A. (2004). Liposome-mediated Gentamicin Delivery: Development and Activity Againsts Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55, 269-271.
- Mugabe, C., et al. (2006). Mechanism of Enhanced Activity of Liposome-Entrapped Aminoglycosides againsts Resistant Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(6); 2016-2022.
- Nacucchio, M. C., Bellora, M.J.G., Sordelli, D.O., dan D'Aquino, M. (1987). Enhanced liposome-mediated antibacterial activity of piperacillin and gentamicin against gram-negative bacilli *in vitro*. *J. Microencapsulation* 5(4), 303-309.

- Oh, Y.K., Nix, D.E., dan Straubinger, R.M. (1995). Formulation and Efficacy of Liposome-Encapsulated Antibiotics for Therapy of Intracellular Mycobacterium avium Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(9), 2104-2111.
- Omri, A. dan Ravaoarino, M. (1995). Preparation, Properties and the Effects of Amikacin, Netilmicin and Tobramycin in Free and Liposomal Formulation on Gram-negative and Gram-positive Bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 7, 9-14.
- Omri, A., Suntres, Z.E., dan Shek, P.N. (2002). Enhanced Activity of Liposomal Polymyxin B Againsts Pseudomonas aeruginosa in a Rat Model of Lung Infection. *Biochemical Pharmacology* 64, 1407-1413.
- Pelczar, M.S. (1986). *Dasar-Dasar Mikrobiologi (Jilid ke-1)*. (hal. 116-118, 198-203). Jakarta: UI Press.
- Reynold, J.E.F. (1982). *Martindale: The Extra Pharmacopeia (28th ed.)*. (hal. 1066). London: The Pharmaceutical Press.
- Rukholm, G., *et al.* (2005). Antibacterial Activity of Liposomal Gentamicin Againsts Pseudomonas aeruginosa: a time kill-study. *International Journal of Antimicrobial Agents* 27, 247-252.
- Saputra, L.A. (2011). Pengaruh Frekuensi Siklus Ekstruksi dan Penambahan Asam Oleat dalam Pembentukan Nanopartikel Liposom untuk Penjerapan Spiramisin. *Skripsi Sarjana Farmasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Strohl W. (1999). Secondary metabolites, antibiotic. Di dalam: Flickinger M., Stephen W.D. *Encyclopedia: Bioprocess technology, fermentation, biocatalysis, and bioseparation* (Vols 1-5). New York: John wiley and son.
- Swarbrick, J. (2007). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (3rd Ed.). New York: Informa Health Care USA.
- Swarbrick, J. dan Boyland, J.C. (1994). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (Vol. 9). New York: Dekker.
- Williams, R. O., dan Vaughn, J. M. (2007). Nanoparticle Engineering. Dalam J. Swarbrick, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Third Edition Volume I*. New York: Informa Healthcare.
- Windholz, M. (1976). *The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals and Drugs (9th ed.)*. New Jersey: Merck and Co. Int. Rahway.



GAMBAR



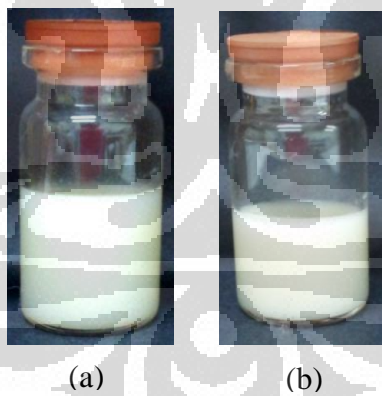
Gambar 3.1. Alat yang digunakan : (a) *Vacuum Rotary Evaporator*, (b) *Scanning Electron Microscopy (SEM)*, (c) *Alat Coating*, (d) *Alat Pewarnaan Gram*, (e) *Bio Safety Cabinet (BSC)*, (f) *Inkubator Suhu 37°C*



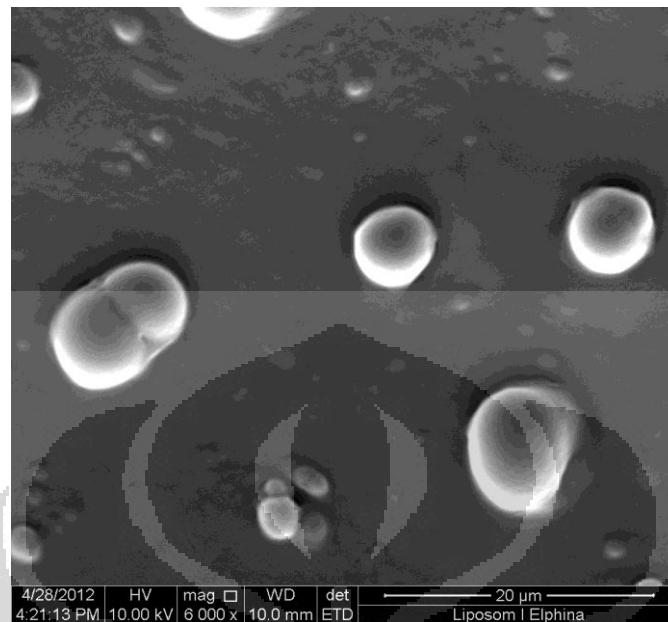
Gambar 3.2. Gambar alat yang dipakai: (a) pH Meter, (b) Hot Plate dan Stirrer, (c) Oven Pengering, (d) Oven Pengering, (e) Timbangan Analitik, (f) Mikroskop Optik, (g) Vortex



Gambar 3.3. Gambar alat yang dipakai: (a) Lemari Pendingin dan (b) Autoklaf



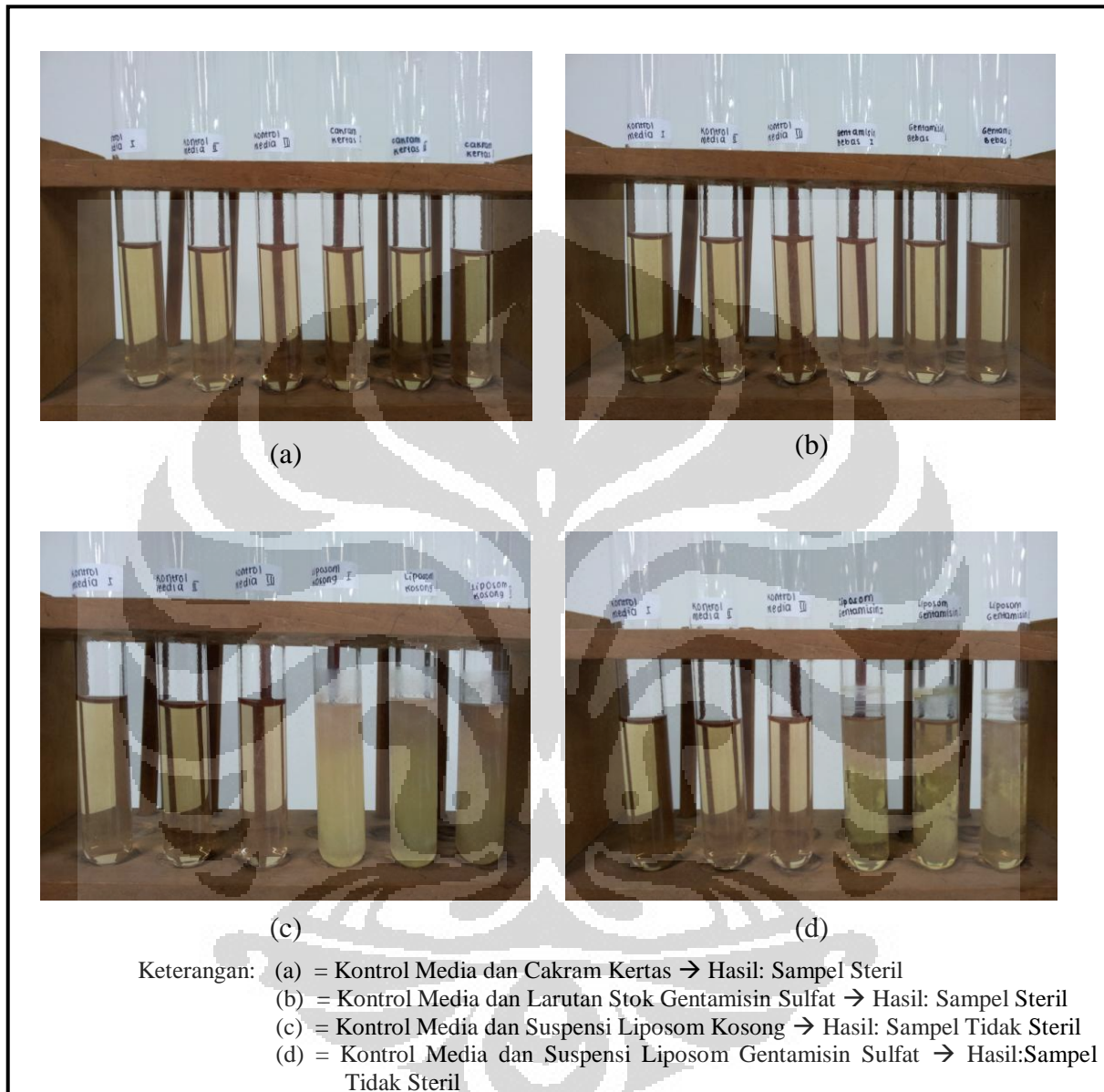
Gambar 4.1. Gambar suspensi (a) Suspensi Liposom Kosong dan (b) Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat



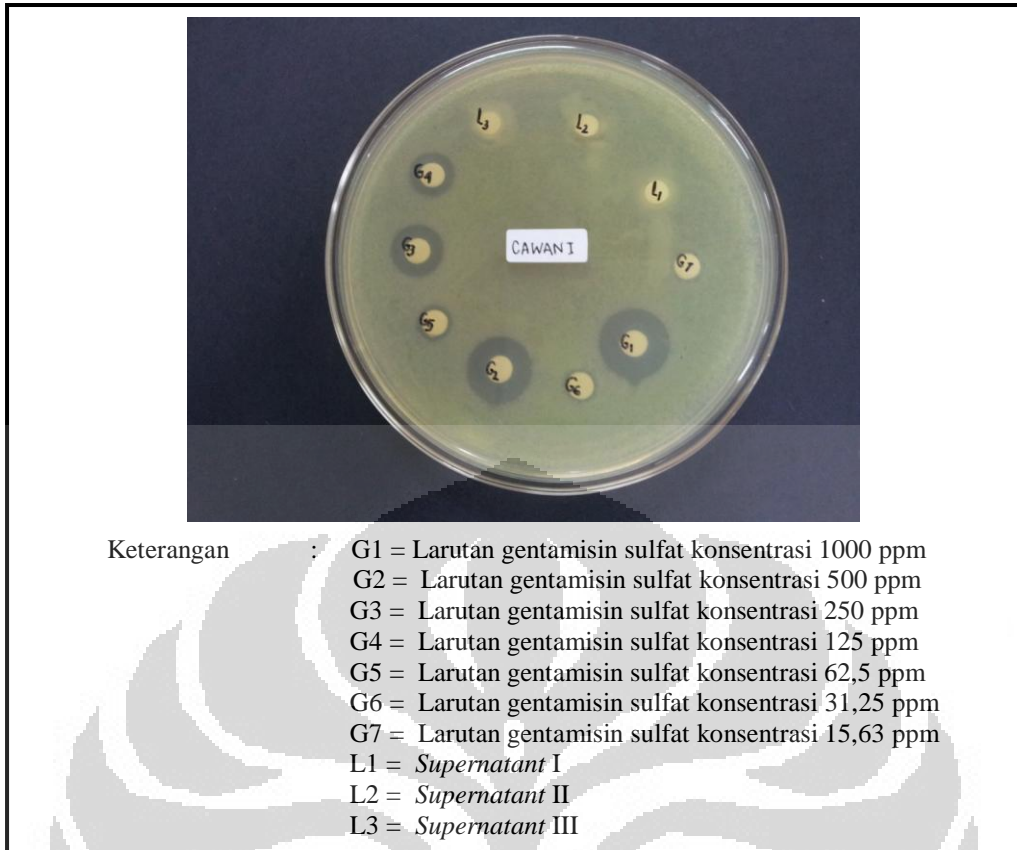
Gambar 4.2. Hasil Pemeriksaan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) Suspensi Liposom Kosong



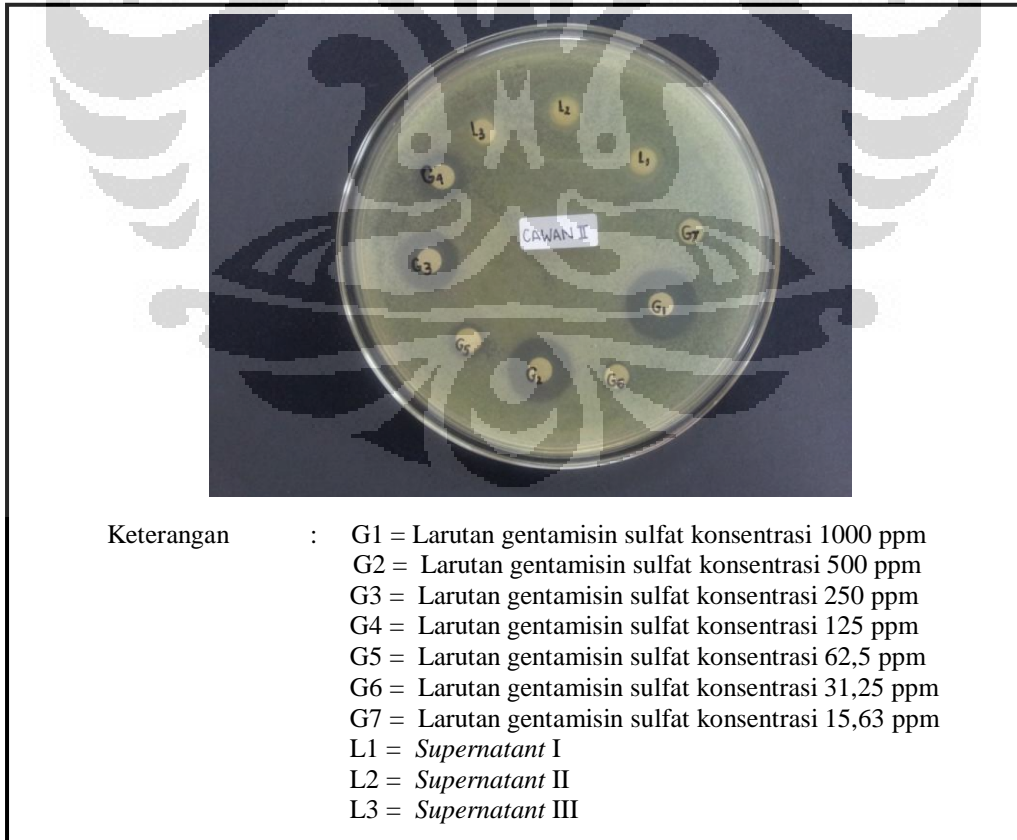
Gambar 4.3. Hasil Pemeriksaan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat



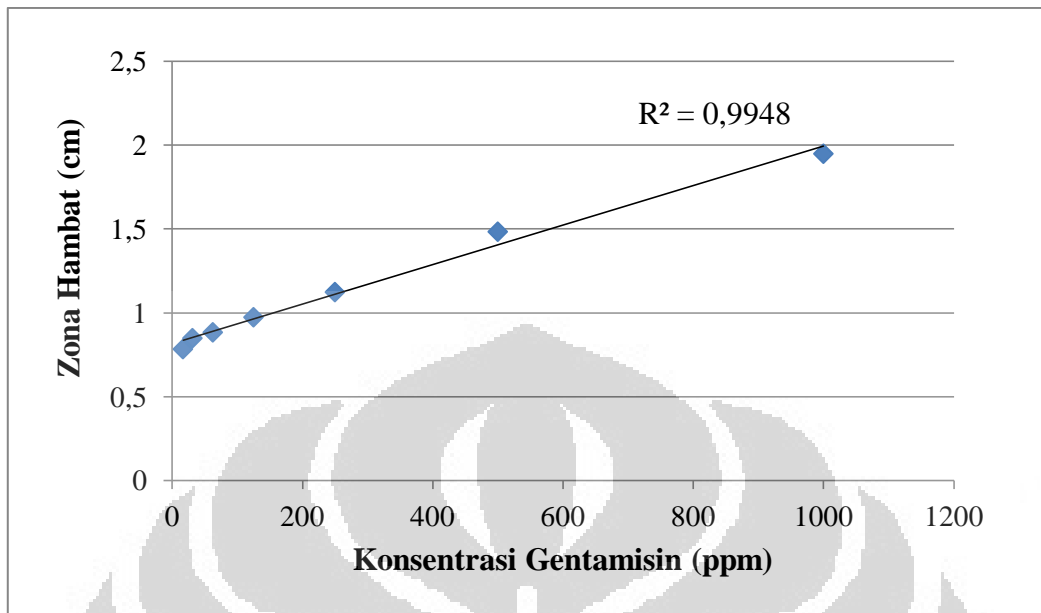
Gambar 4.4. Hasil Uji Sterilitas



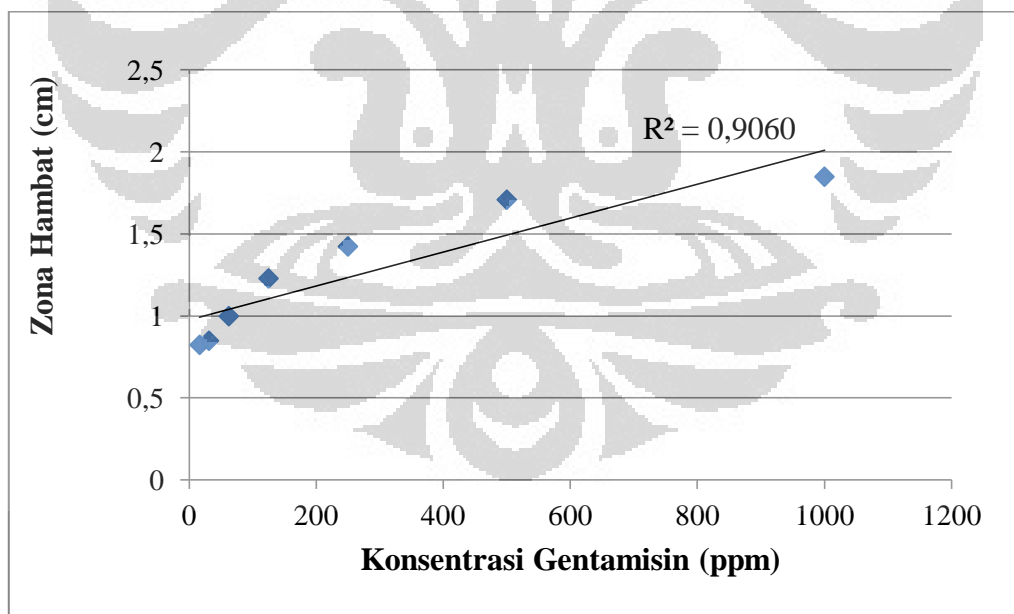
Gambar 4.5. Hasil Uji I Penentuan Efisiensi Penjerapan dengan Metode Cakram



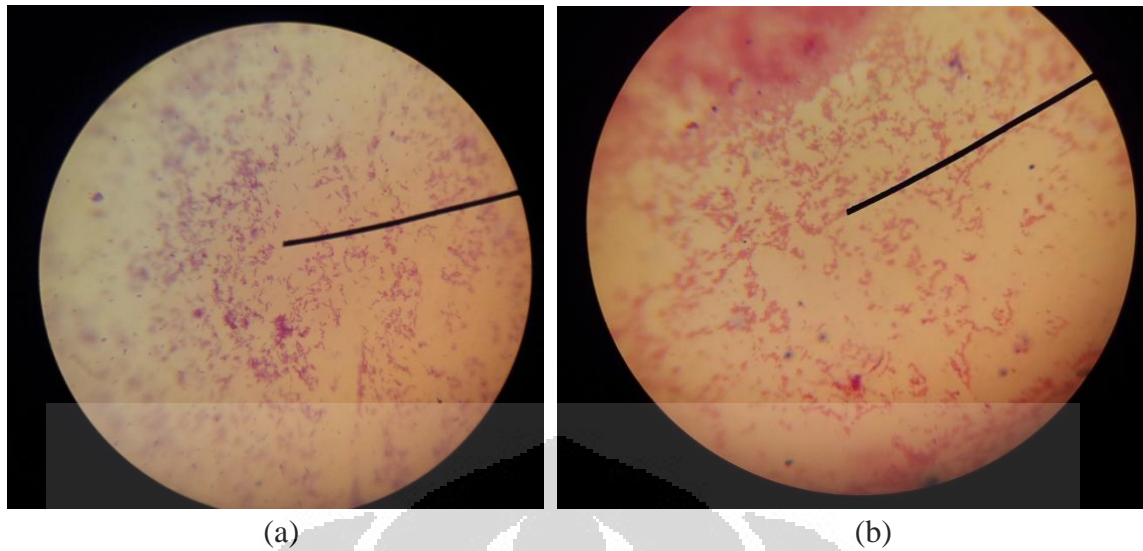
Gambar 4.6. Hasil Uji II Penentuan Efisiensi Penjerapan dengan Metode Cakram



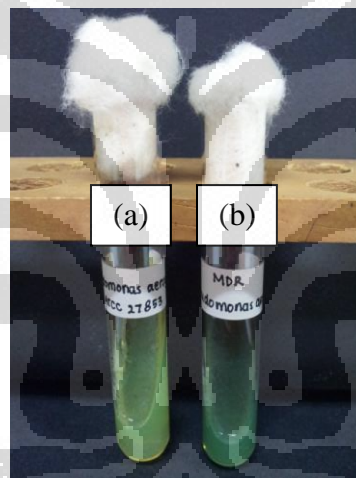
Gambar 4.7. Grafik Hubungan Konsentrasi Gentamisin dengan Zona Hambat pada Hasil Uji Penetapan I Efisiensi Penjerapan Liposom dengan Metode Cakram



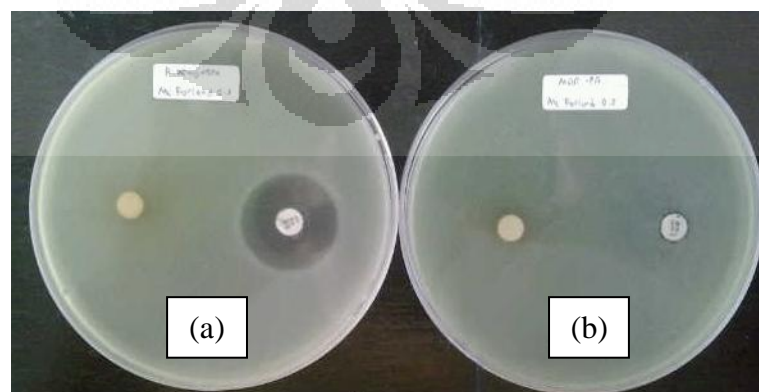
Gambar 4.8. Grafik Hubungan Konsentrasi Gentamisin dengan Zona Hambat pada Hasil Uji Penetapan II Efisiensi Penjerapan Liposom dengan Metode Cakram



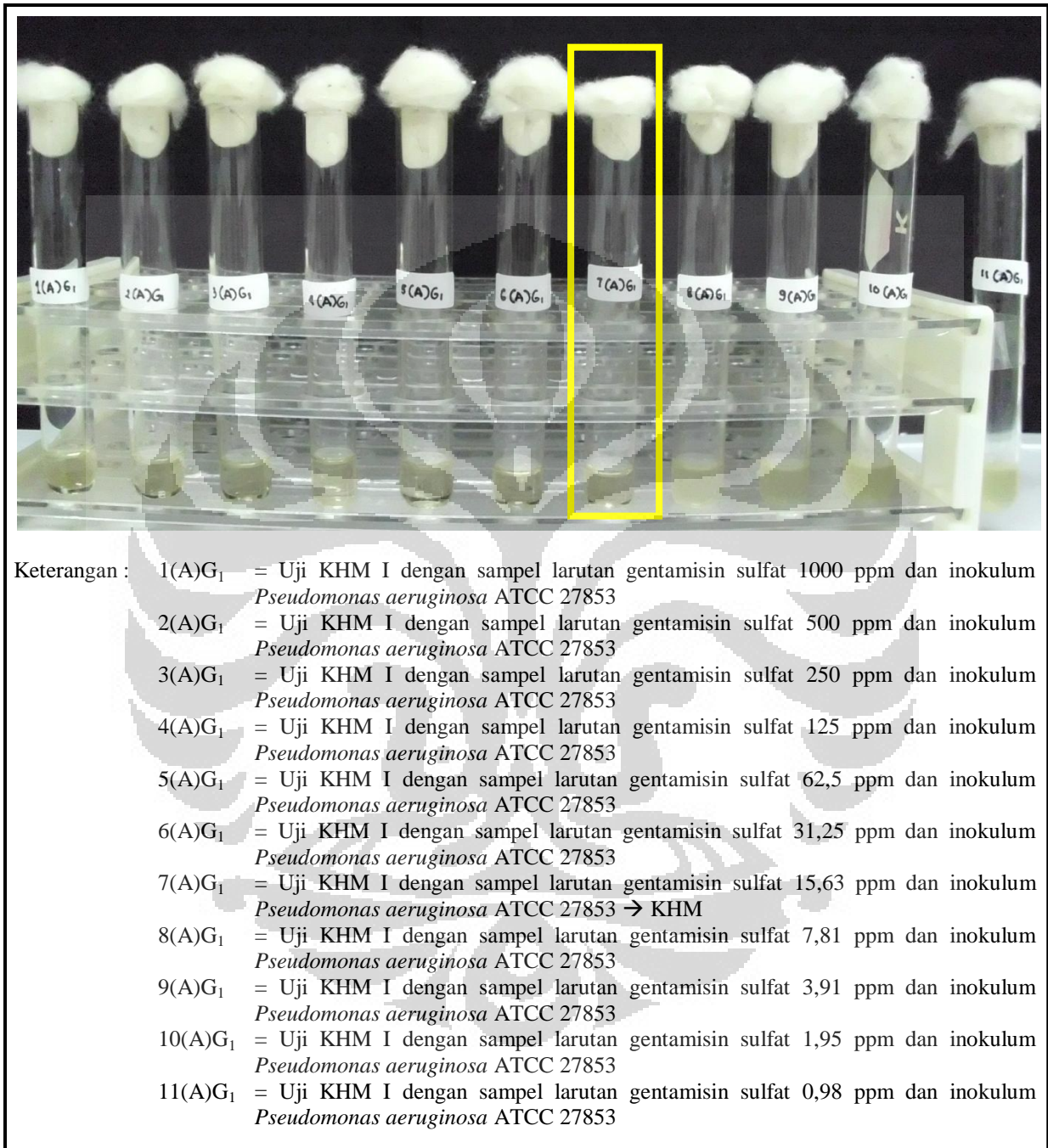
Gambar 4.9. Pengamatan Mikroskopik Pewarnaan Gram (a)*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (b)*Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*



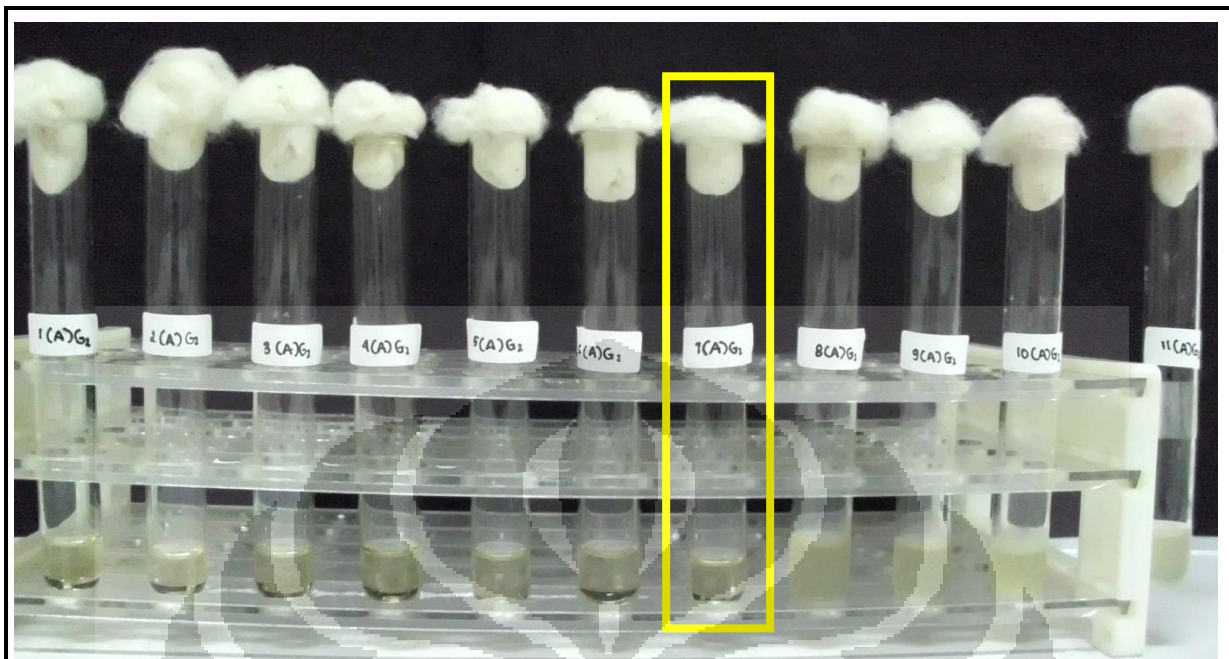
Gambar 4.10. Warna Koloni pada Agar Cetrimide (a)*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (b) *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*



Gambar 4.11. Hasil Uji Resistensi (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (b) *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* dengan blanko cakram kosong (kiri) dan cakram larutan gentamisin sulfat (kanan).

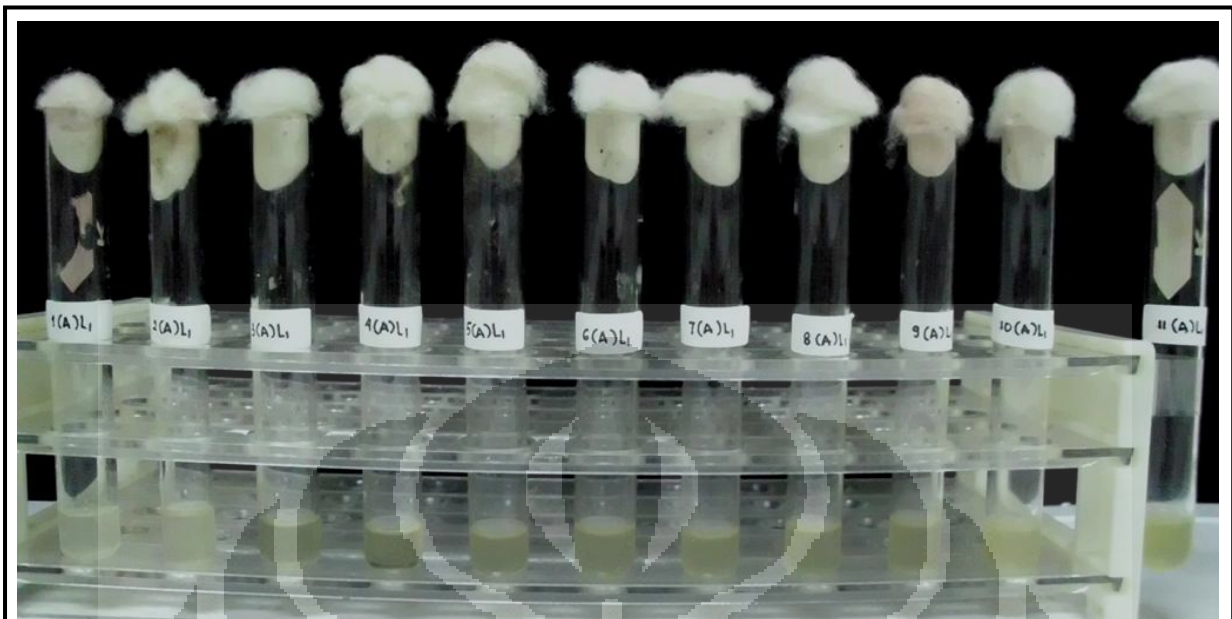


Gambar 4.12. Hasil Uji KHM I Larutan Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



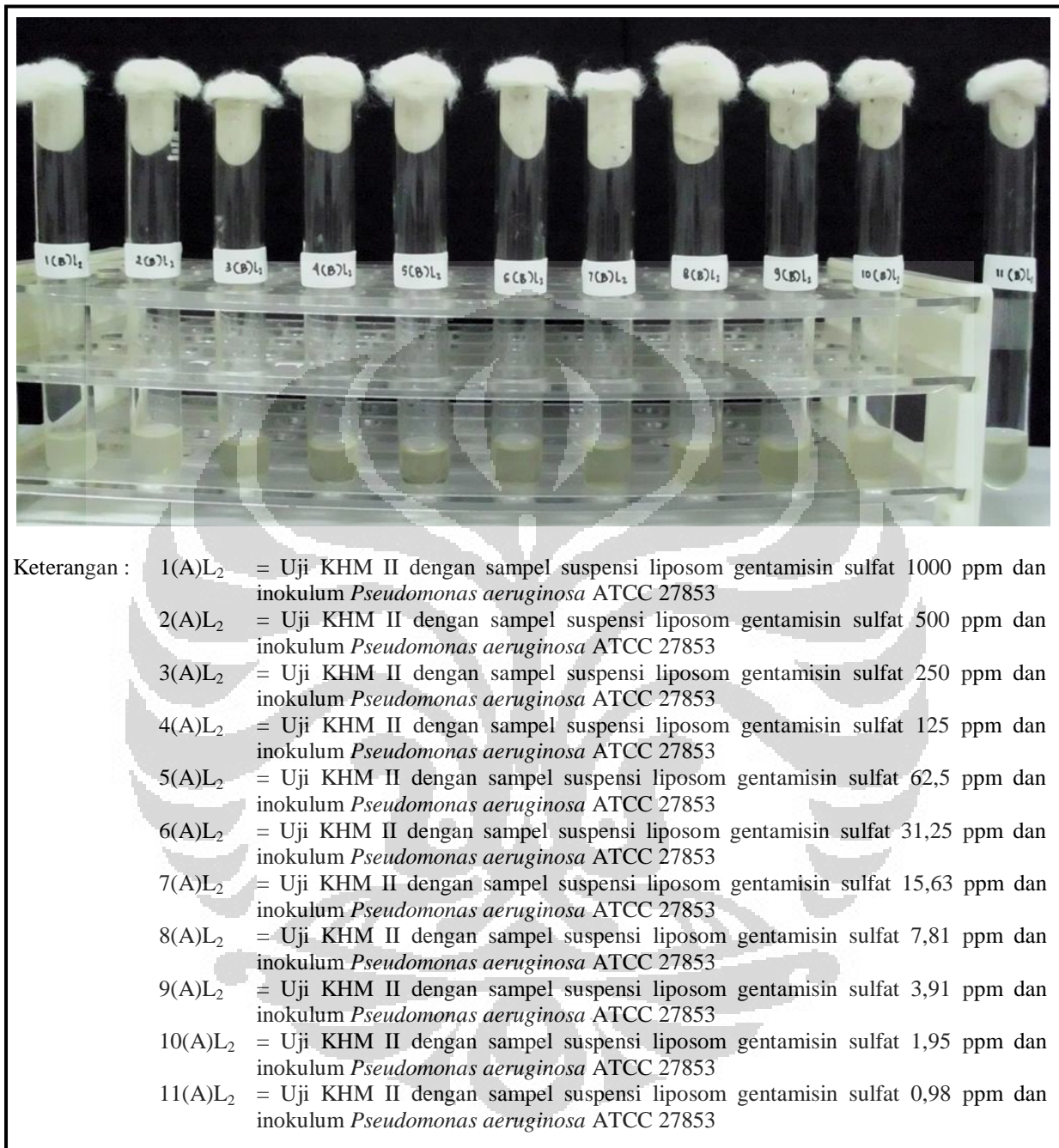
- Keterangan :
- 1(A)G₂ = Uji KHM II dengan sampel larutan gentamisin sulfat 1000 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 2(A)G₂ = Uji KHM II dengan sampel larutan gentamisin sulfat 500 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 3(A)G₂ = Uji KHM II dengan sampel larutan gentamisin sulfat 250 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 4(A)G₂ = Uji KHM II dengan sampel larutan gentamisin sulfat 125 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 5(A)G₂ = Uji KHM II dengan sampel larutan gentamisin sulfat 62,5 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 6(A)G₂ = Uji KHM II dengan sampel larutan gentamisin sulfat 31,25 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 7(A)G₂ = Uji KHM II dengan sampel larutan gentamisin sulfat 15,63 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 → KHM
 - 8(A)G₂ = Uji KHM II dengan sampel larutan gentamisin sulfat 7,81 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 9(A)G₂ = Uji KHM II dengan sampel larutan gentamisin sulfat 3,91 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 10(A)G₂ = Uji KHM II dengan sampel larutan gentamisin sulfat 1,95 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 11(A)G₁ = Uji KHM 1 dengan sampel larutan gentamisin sulfat 0,98 ppm inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Gambar 4.13. Hasil Uji KHM II Larutan Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

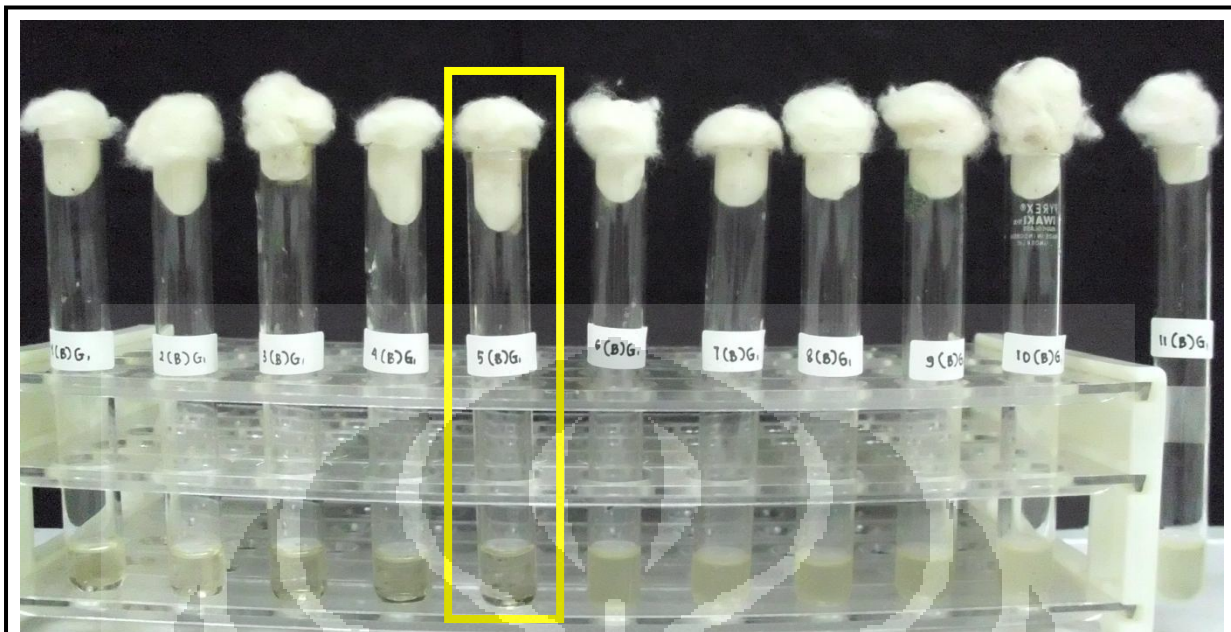


- Keterangan :
- 1(A)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 1000 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 2(A)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 500 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 3(A)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 250 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 4(A)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 125 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 5(A)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 62,5 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 6(A)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 31,25 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 7(A)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 15,63 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 8(A)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 7,81 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 9(A)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 3,91 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 10(A)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 1,95 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 - 11(A)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 0,98 ppm dan inokulum *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Gambar 4.14. Hasil Uji KHM I Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

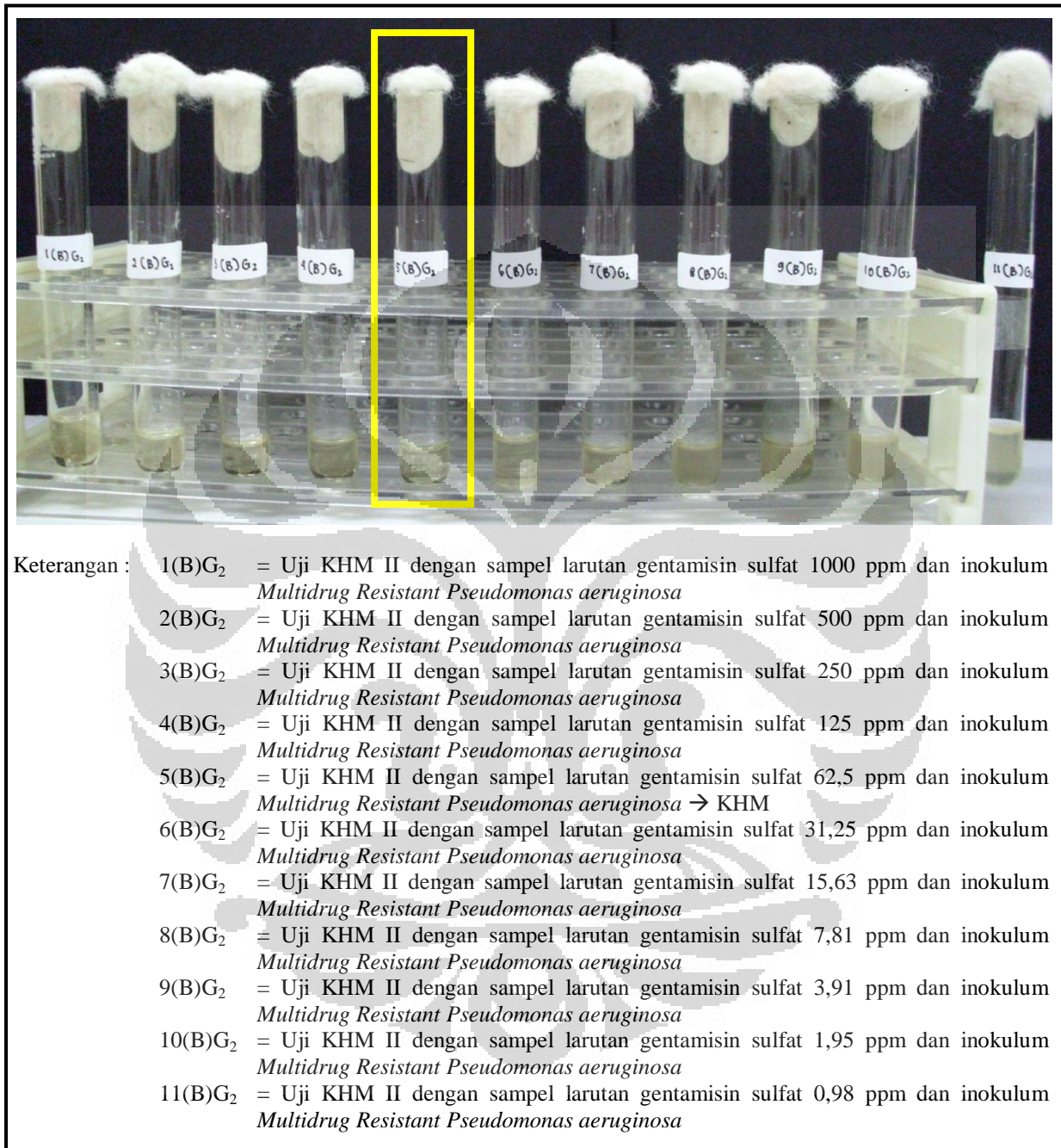


Gambar 4.15. Hasil Uji KHM II Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

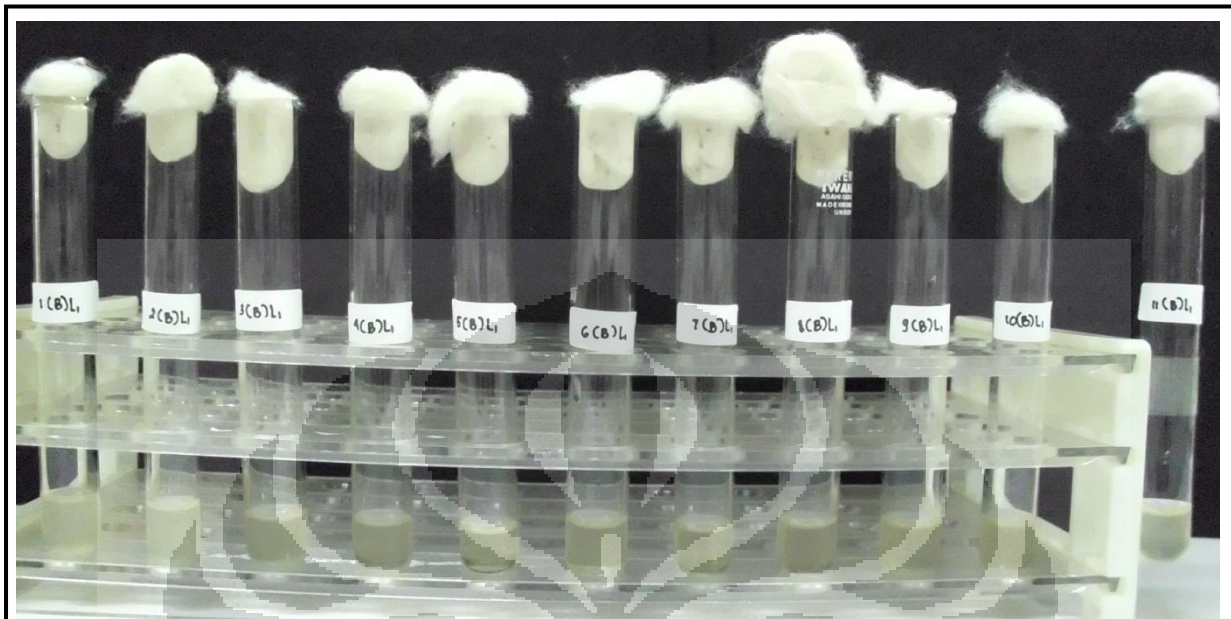


- Keterangan :
- 1(B)G₁ = Uji KHM I dengan sampel larutan gentamisin sulfat 1000 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 2(B)G₁ = Uji KHM I dengan sampel larutan gentamisin sulfat 500 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 3(B)G₁ = Uji KHM I dengan sampel larutan gentamisin sulfat 250 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 4(B)G₁ = Uji KHM I dengan sampel larutan gentamisin sulfat 125 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 5(B)G₁ = Uji KHM I dengan sampel larutan gentamisin sulfat 62,5 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa* → KHM
 - 6(B)G₁ = Uji KHM I dengan sampel larutan gentamisin sulfat 31,25 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 7(B)G₁ = Uji KHM I dengan sampel larutan gentamisin sulfat 15,63 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 8(B)G₁ = Uji KHM I dengan sampel larutan gentamisin sulfat 7,81 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 9(B)G₁ = Uji KHM I dengan sampel larutan gentamisin sulfat 3,91 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 10(B)G₁ = Uji KHM I dengan sampel larutan gentamisin sulfat 1,95 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 11(B)G₁ = Uji KHM I dengan sampel larutan gentamisin sulfat 0,98 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

Gambar 4.16. Hasil Uji KHM I Larutan Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

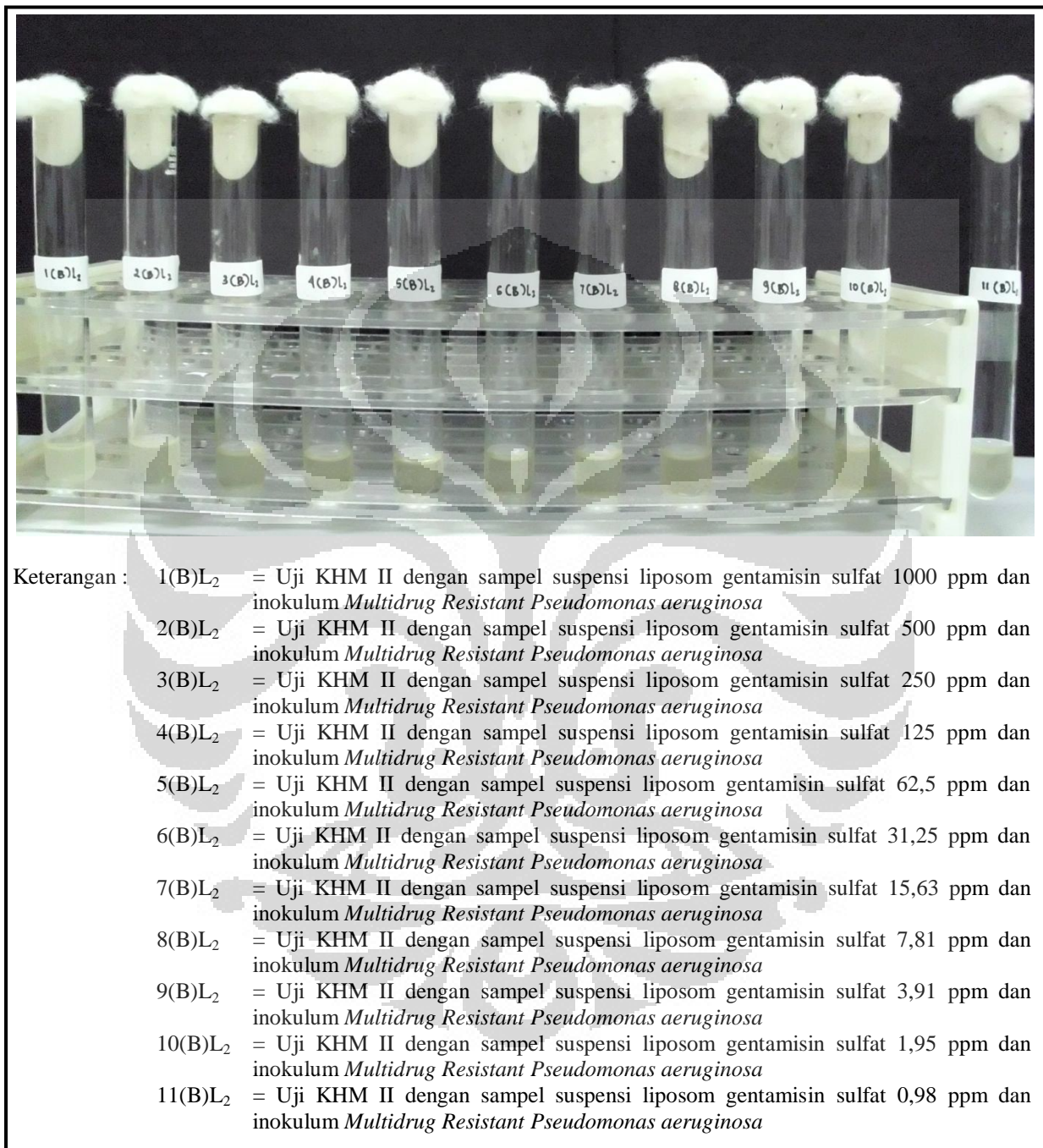


Gambar 4.17. Hasil Uji KHM II Larutan Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

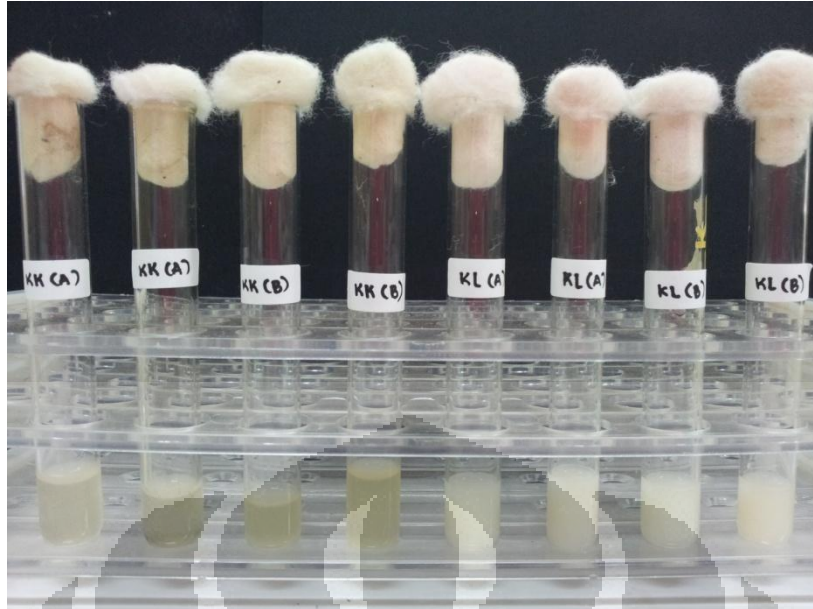


- Keterangan :
- 1(B)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 1000 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 2(B)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 500 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 3(B)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 250 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 4(B)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 125 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 5(B)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 62,5 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 6(B)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 31,25 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 7(B)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 15,63 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 8(B)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 7,81 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 9(B)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 3,91 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 10(B)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 1,95 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 - 11(B)L₁ = Uji KHM I dengan sampel suspensi liposom gentamisin sulfat 0,98 ppm dan inokulum *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

Gambar 4.18. Hasil Uji KHM I Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

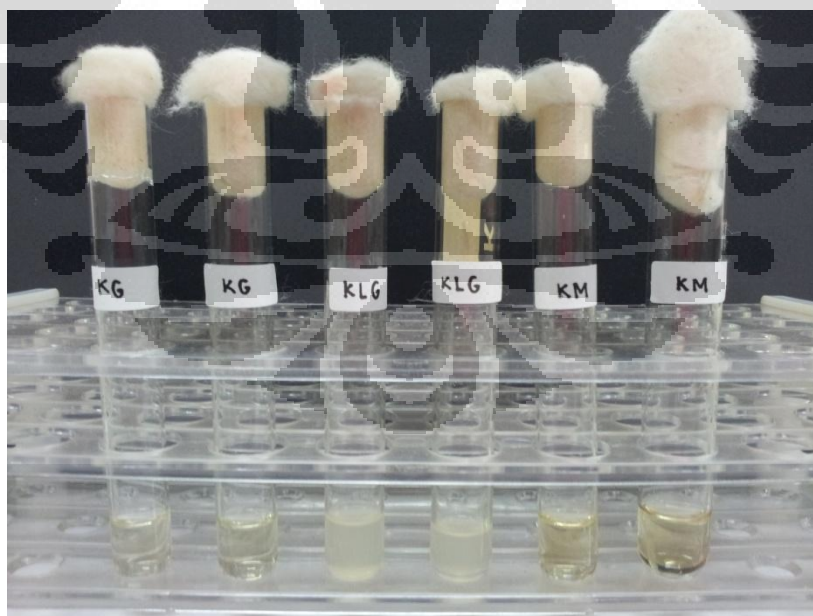


Gambar 4.19. Hasil Uji KHM II Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*



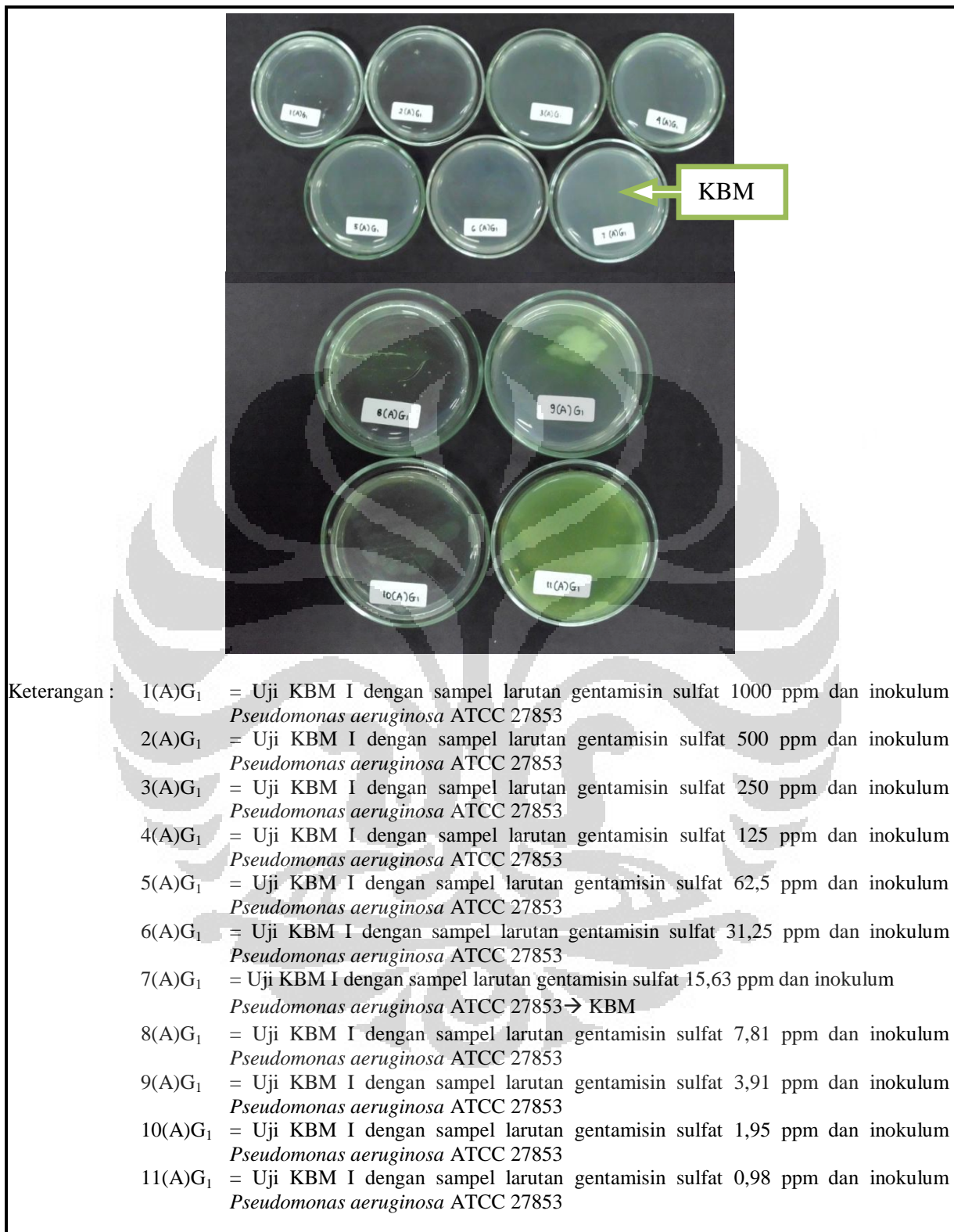
Keterangan: KK(A) = Kontrol Kuman *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 KK(B) = Kontrol Kuman *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 KL(A) = Kontrol Suspensi Liposom Kosong dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 KL(B) = Kontrol Suspensi Liposom Kosong dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

Gambar 4.20. Kontrol Positif Uji KHM

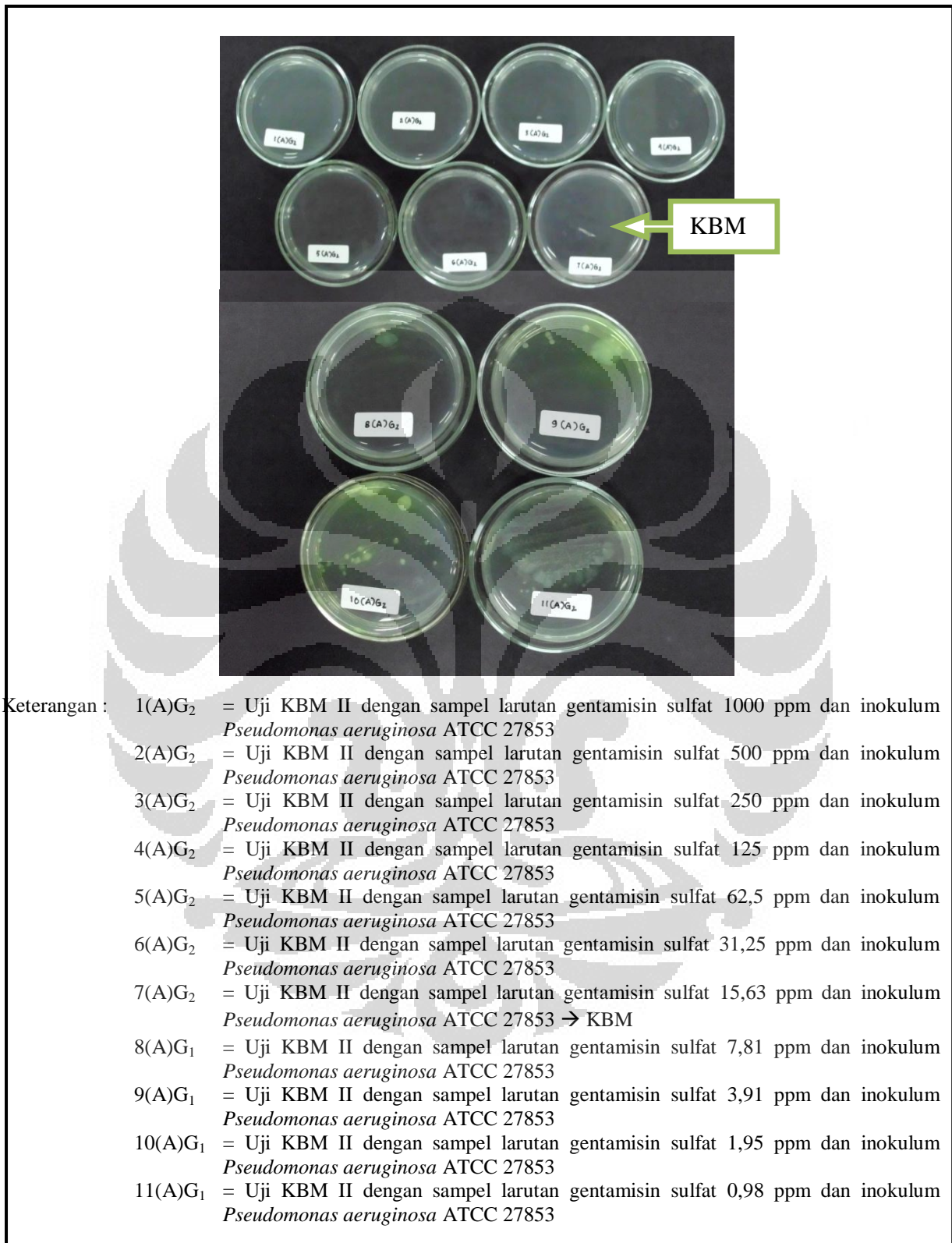


Keterangan: KG = Kontrol Larutan Stok Gentamisin Sulfat
 KLG = Kontrol Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat
 KM = Kontrol Media

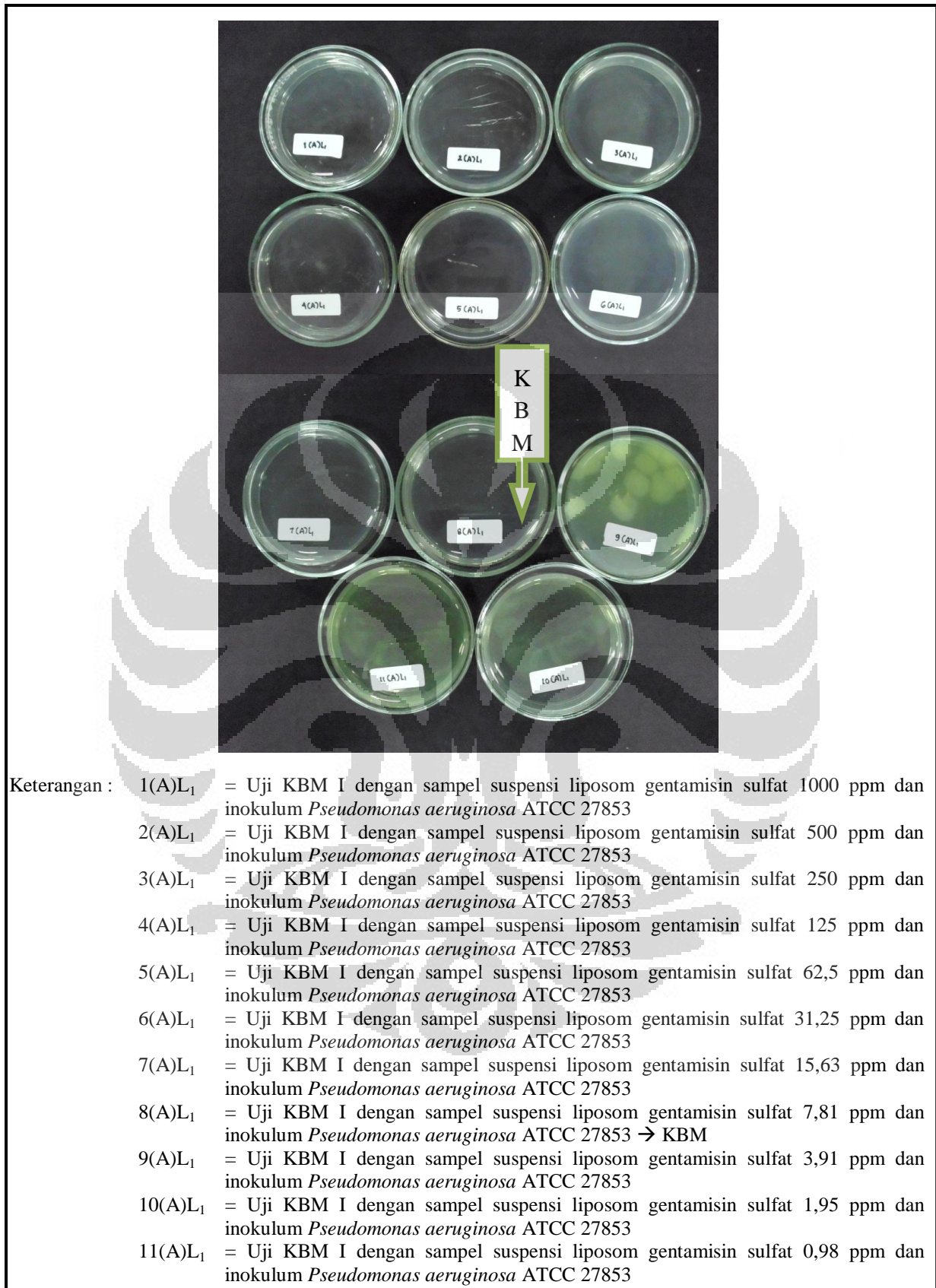
Gambar 4.21. Kontrol Negatif Uji KHM



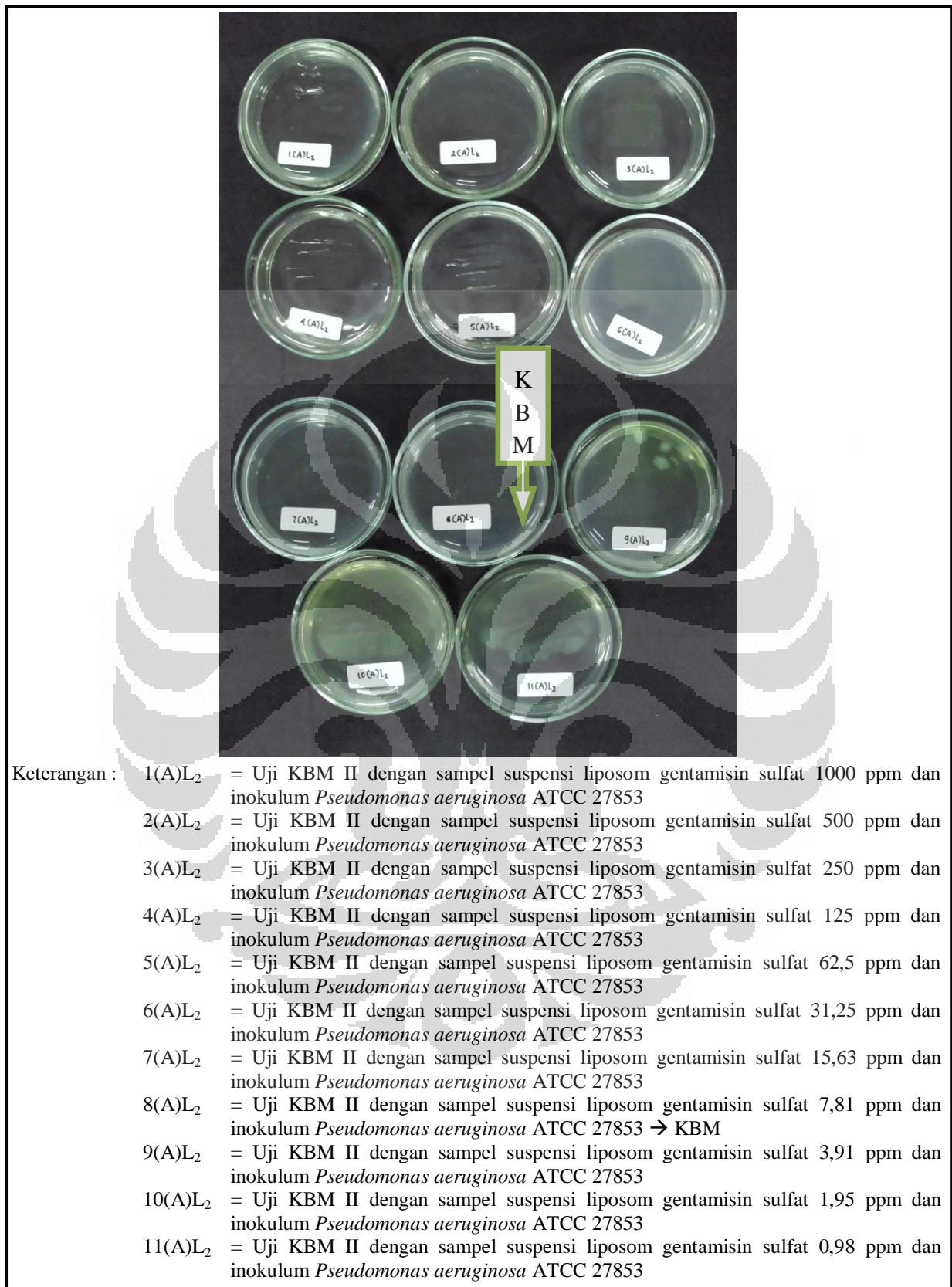
Gambar 4.22. Hasil Uji KBM I Larutan Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



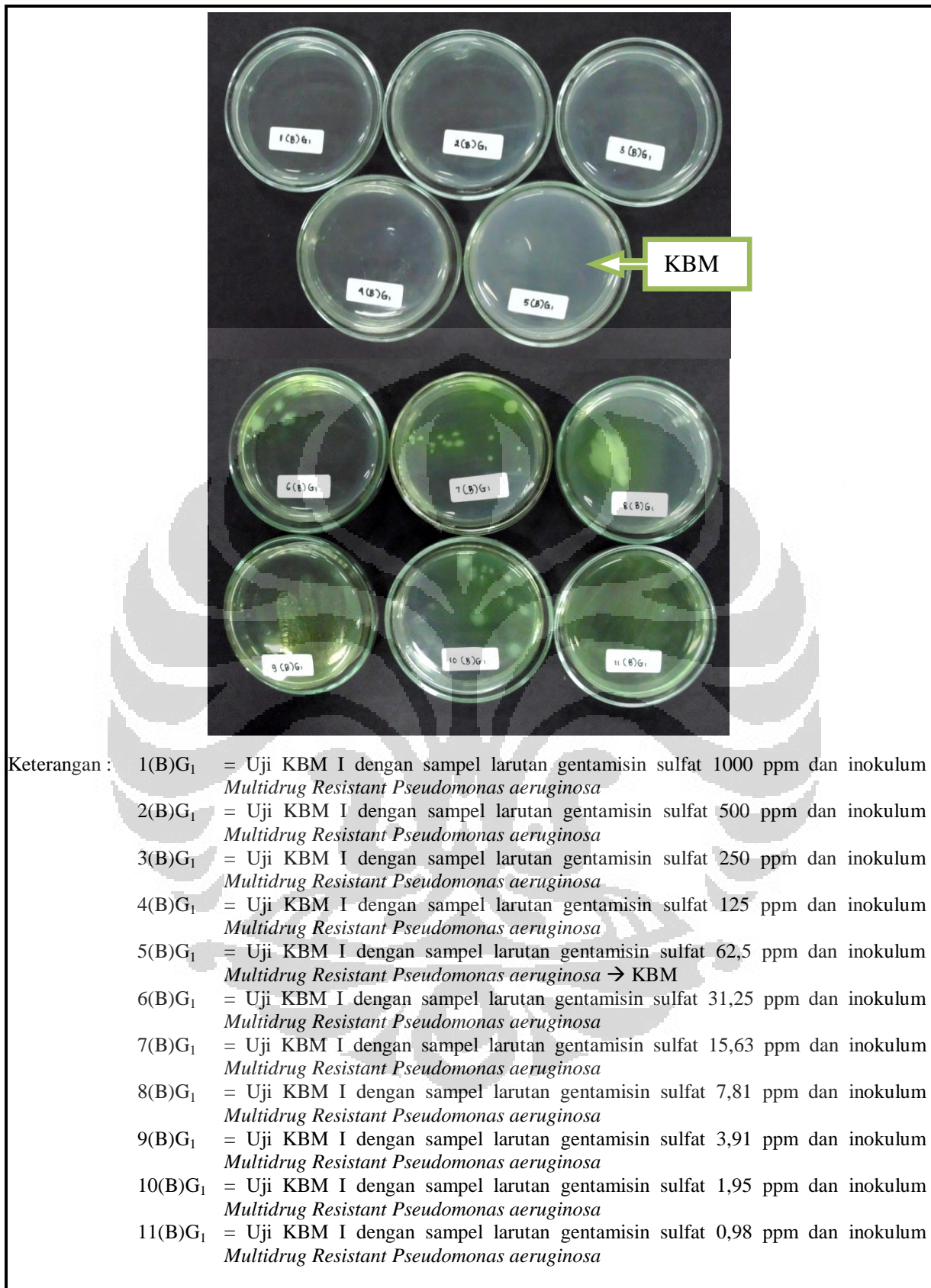
Gambar 4.23. Hasil Uji KBM II Larutan Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



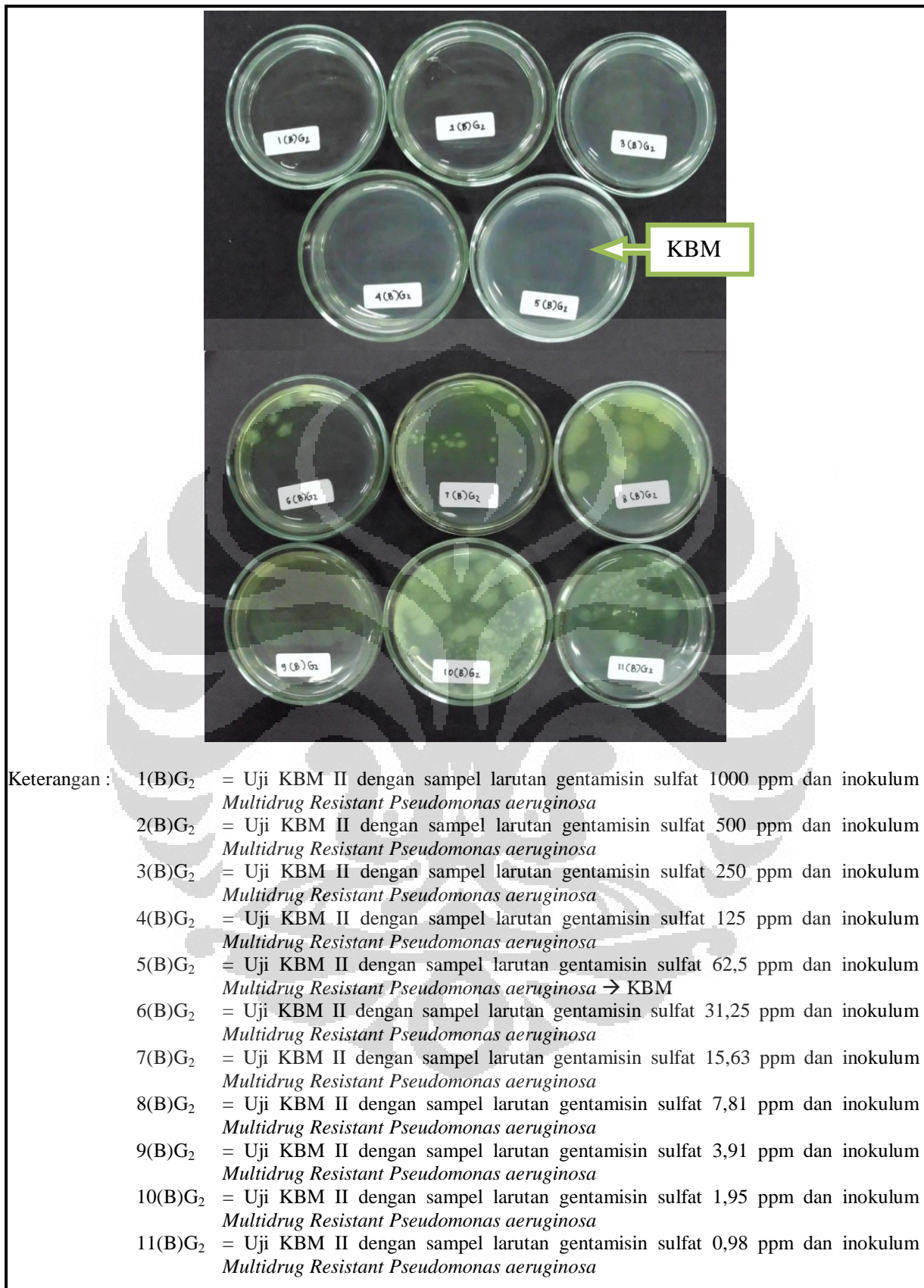
Gambar 4.24. Hasil Uji KBM I Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



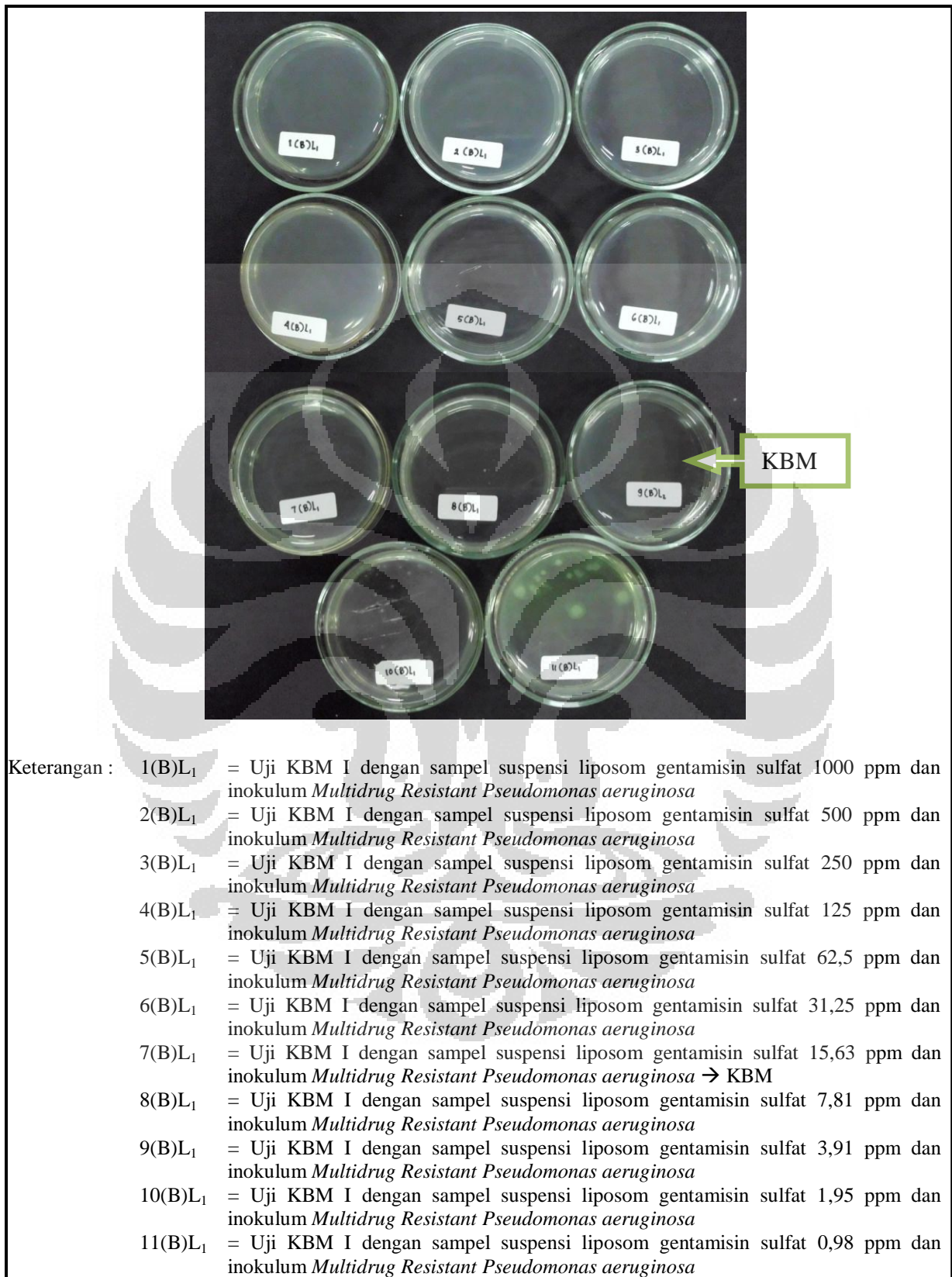
Gambar 4.25. Hasil Uji KBM II Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



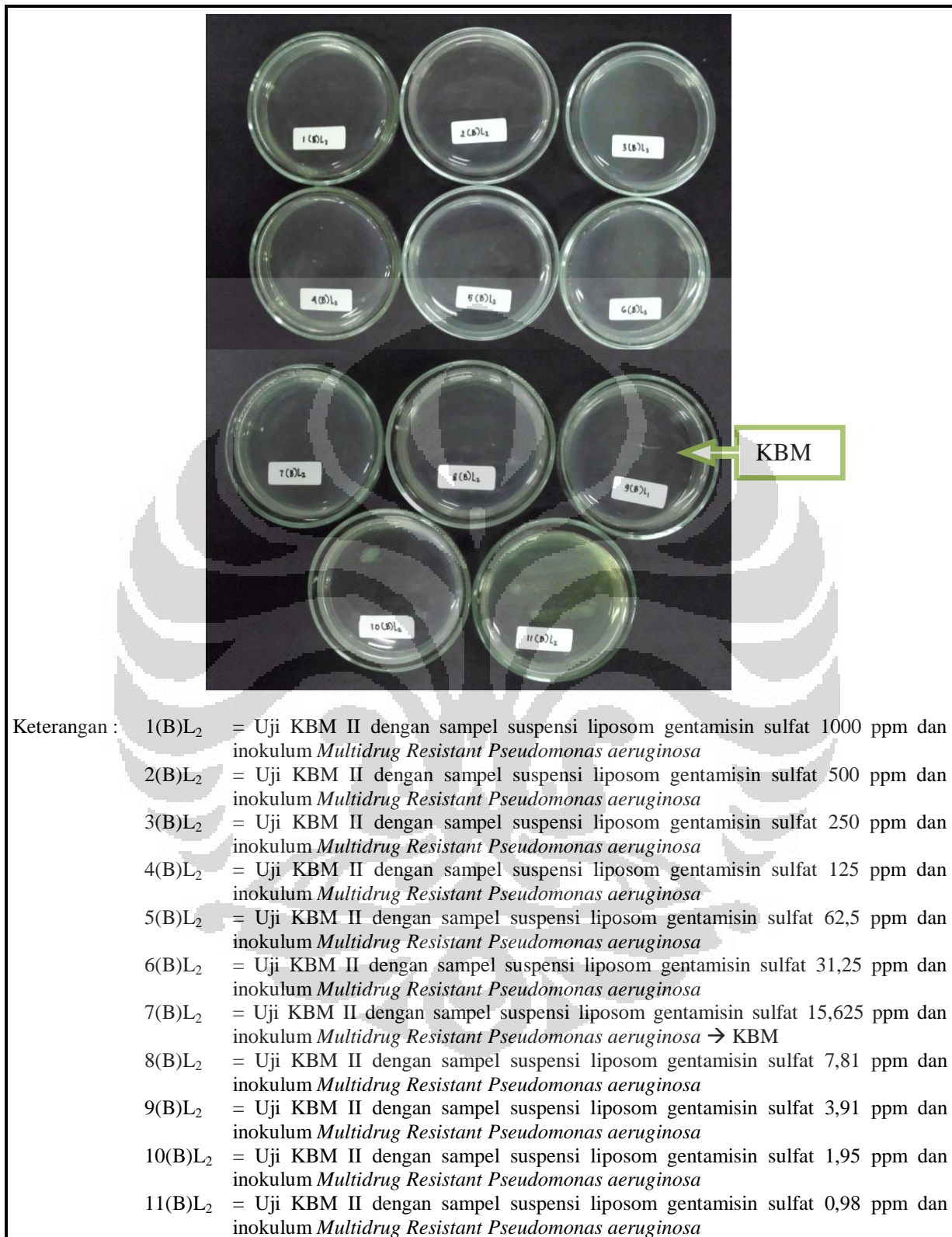
Gambar 4.26. Hasil Uji KBM I Larutan Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*



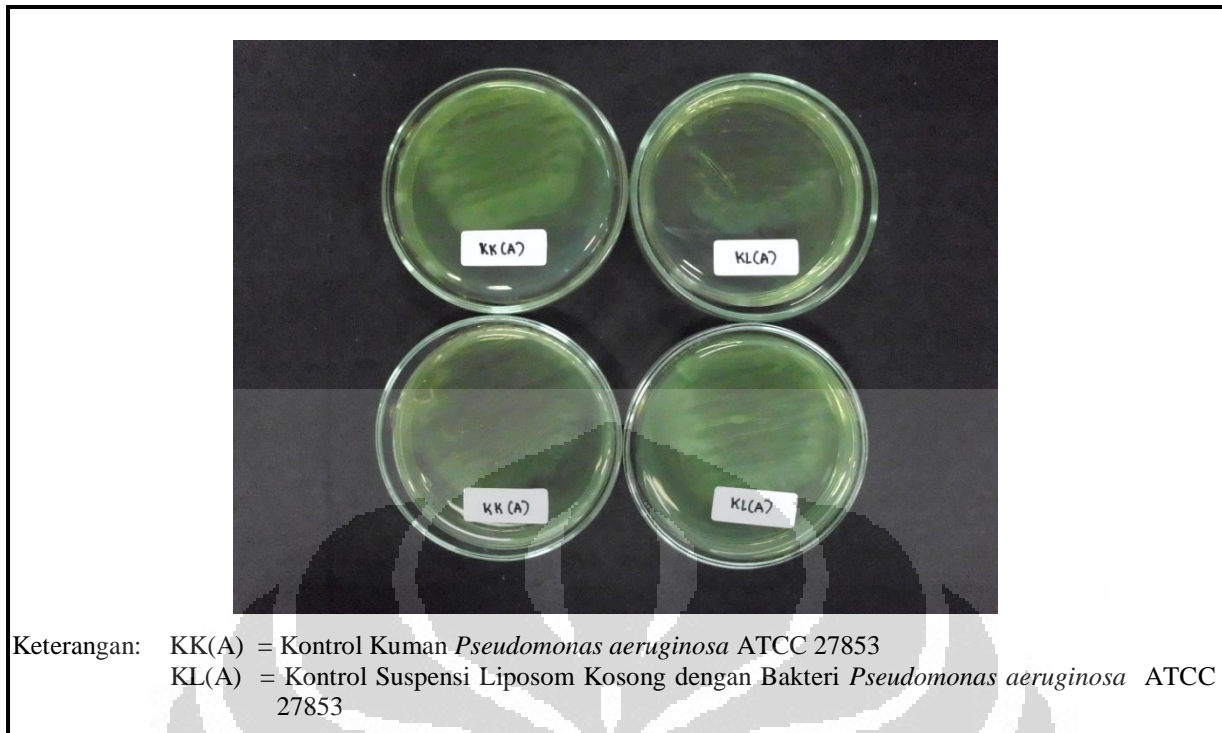
Gambar 4.27. Hasil Uji KBM II Larutan Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*



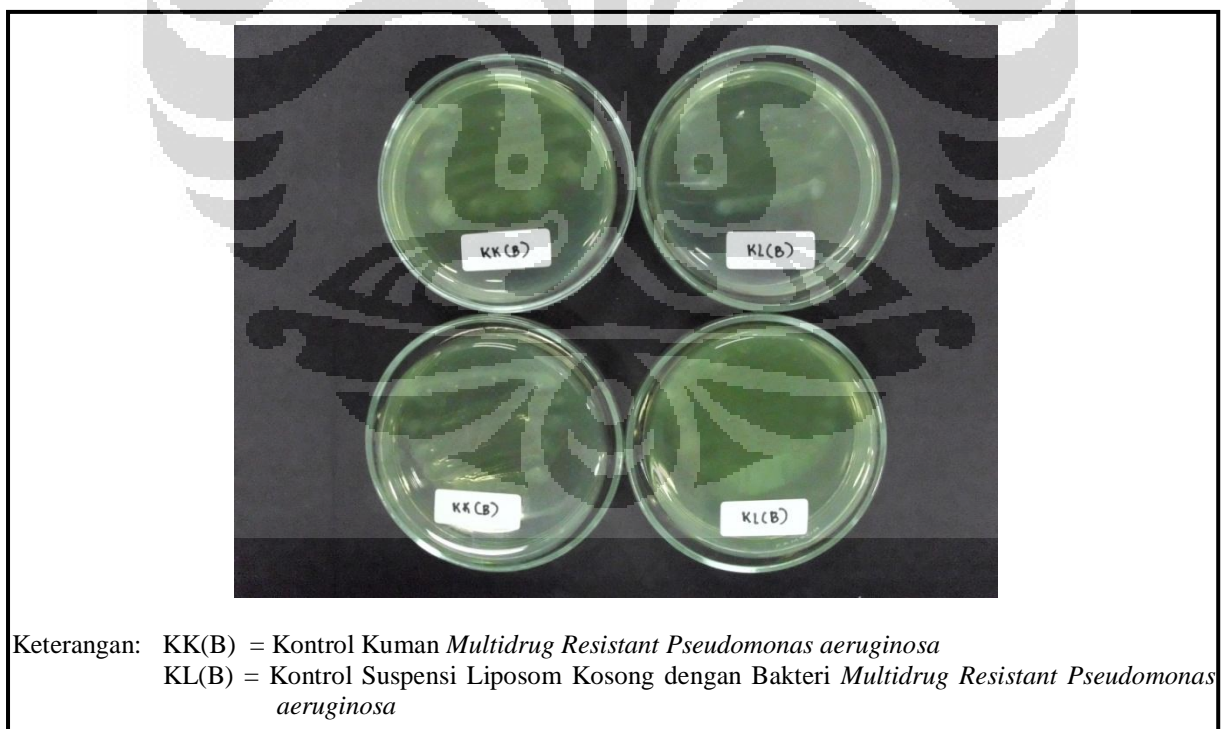
Gambar 4.28. Hasil Uji KBM I Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*



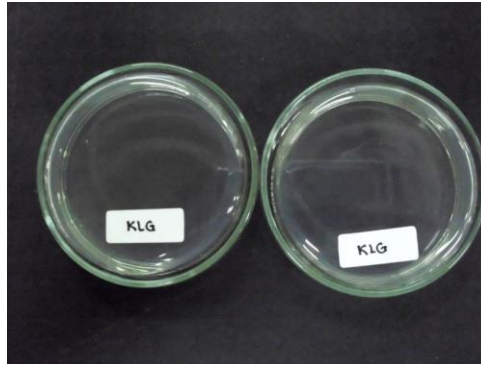
Gambar 4.29. Hasil Uji KBM II Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*



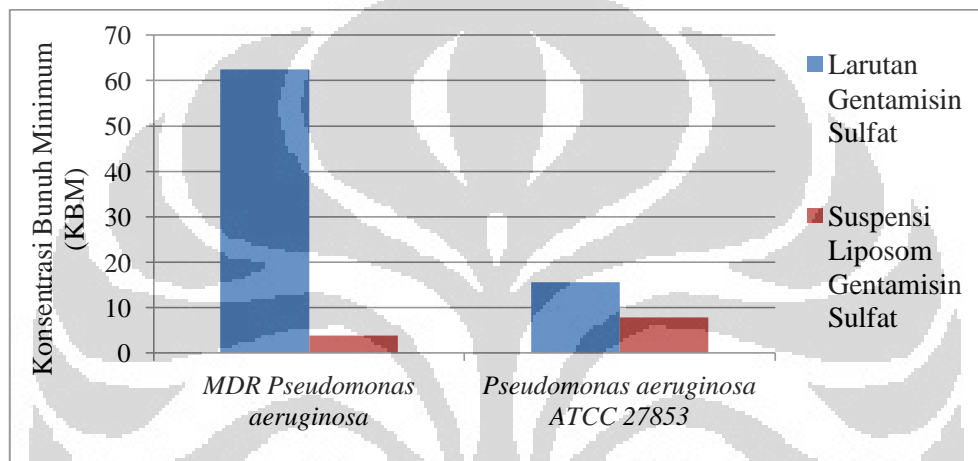
Gambar 4.30. Kontrol Positif Uji KBM



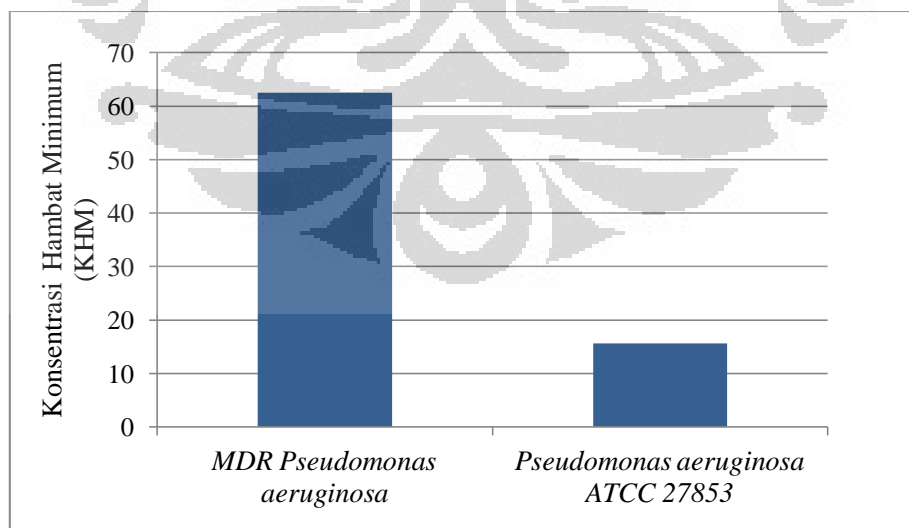
Gambar 4.31. Kontrol Positif Uji KBM



Gambar 4.32. Uji KBM Kontrol Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat (Kontrol Negatif)



Gambar 4.33. Grafik Perbandingan KBM Berdasarkan Strain Bakteri terhadap Larutan Gentamisin Sulfat dan Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat



Gambar 4.34. Grafik Perbandingan KHM Berdasarkan Strain Bakteri terhadap Larutan Gentamisin Sulfat



Tabel 4.1. Hasil Uji Sterilitas

Sampel	I	II	III
Kontrol Media	Jernih	Jernih	Jernih
Cakram Kertas	Jernih	Jernih	Jernih
Gentamisin Bebas	Jernih	Jernih	Jernih
Liposom Kosong	Keruh	Keruh	Keruh
Liposom Gentamisin	Keruh	Keruh	Keruh

Tabel 4.2. Hasil Penetapan Efisiensi Penjerapan Liposom dengan Metode Uji Cakram

Konsentrasi Larutan Gentamisin Sulfat (ppm)	Zona Hambat Uji I (cm)	Zona Hambat Uji II (cm)
1000	1,95	1,85
500	1,485	1,71
250	1,125	1,425
125	0,975	1,23
62,5	0,885	1
31,25	0,85	0,85
15,63	0,785	0,825
L1 (Sampel I)	-	-
L2 (Sampel II)	-	-
L3 (Sampel III)	-	-
R =	0.9948	0.9060

Tabel 4.3. Hasil Uji KHM Larutan Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Uji Dilusi	KK (A)	Konsentrasi Larutan Gentamisin Sulfat (ppm)												KM	KG
		1.000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98			
I	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	
II	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	

Keterangan : KK (A) = Kontrol Kuman *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 KM = Kontrol Media
 KG = Kontrol Gentamisin

Tabel 4.4. Hasil Uji KHM Larutan Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

Uji Dilusi	KK (B)	Konsentrasi Larutan Gentamisin Sulfat (ppm)												KM	KG
		1.000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98			
I	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	
II	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	

Keterangan : KK (B) = Kontrol Kuman *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 KM = Kontrol Media
 KG = Kontrol Gentamisin

Tabel 4.5. Hasil Uji KBM Larutan Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Uji KBM	KK (A)	Konsentrasi Larutan Gentamisin Sulfat (ppm)										
		1.000	500	250	125	62,5	31,24	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98
I	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
II	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Keterangan : KK (A) = Kontrol Kuman *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Tabel 4.6. Hasil Uji KBM Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Uji KBM	KK (A)	Konsentrasi Larutan Standar Gentamisin Sulfat (ppm)										
		1.000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
II	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Keterangan : KK (A) = Kontrol Kuman *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Tabel 4.7. Hasil Uji KBM Larutan Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

Uji KBM	KK (B)	Konsentrasi Larutan Gentamisin Sulfat (ppm)										
		1.000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98
I	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
II	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Keterangan : KK (B) = Kontrol Kuman *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

Tabel 4.8. Hasil Uji KBM Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

Uji KBM	KK (B)	Konsentrasi Larutan Standar Gentamisin Sulfat (ppm)											
		1.000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
II	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Keterangan : KK (B) = Kontrol Kuman *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

Tabel 4.9. Hasil Uji KBM Terhadap Kontrol

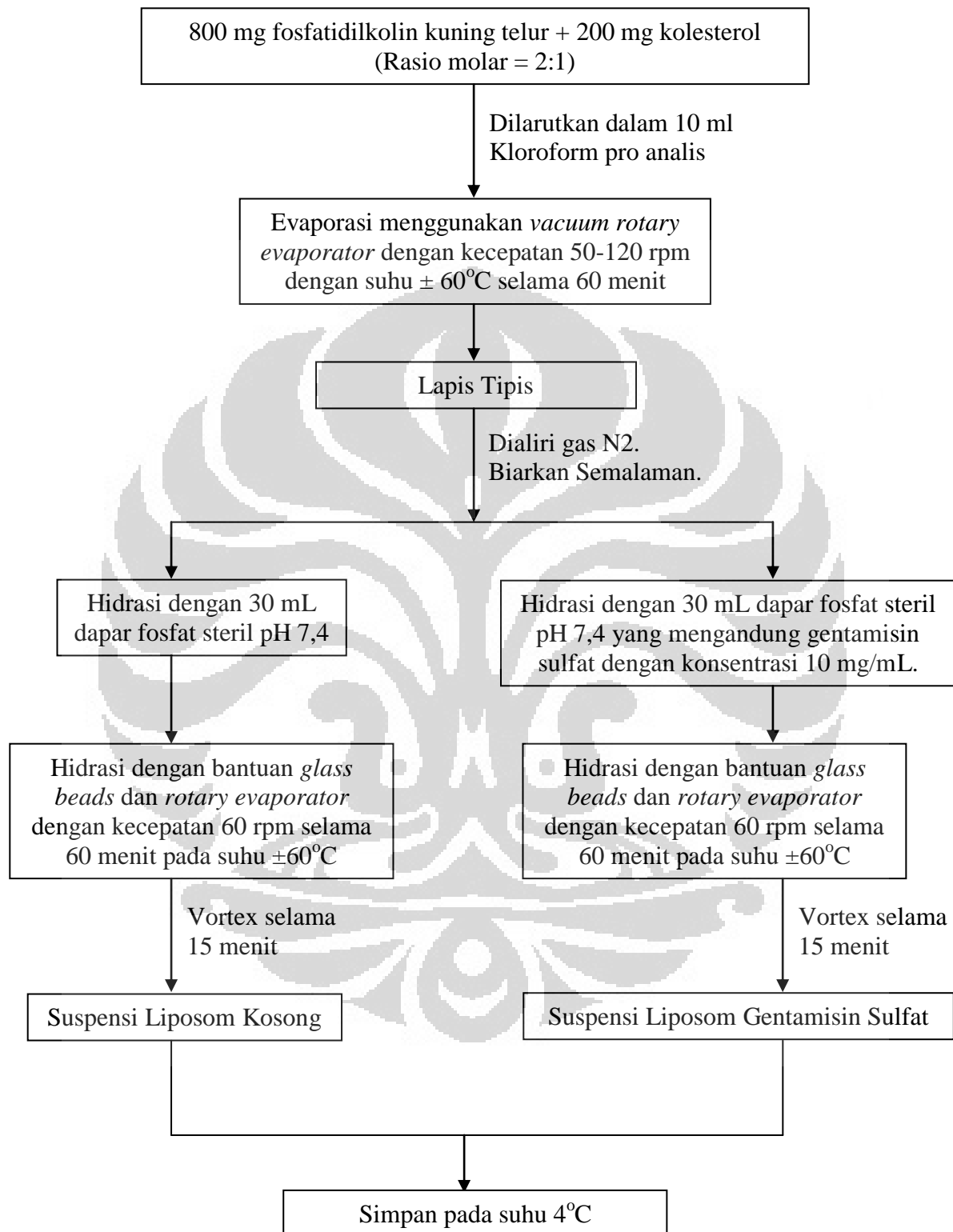
Uji KBM	KK (A)	KK (B)	KL (A)	KL (B)	KLG
I	+	+	+	+	-
II	+	+	+	+	-

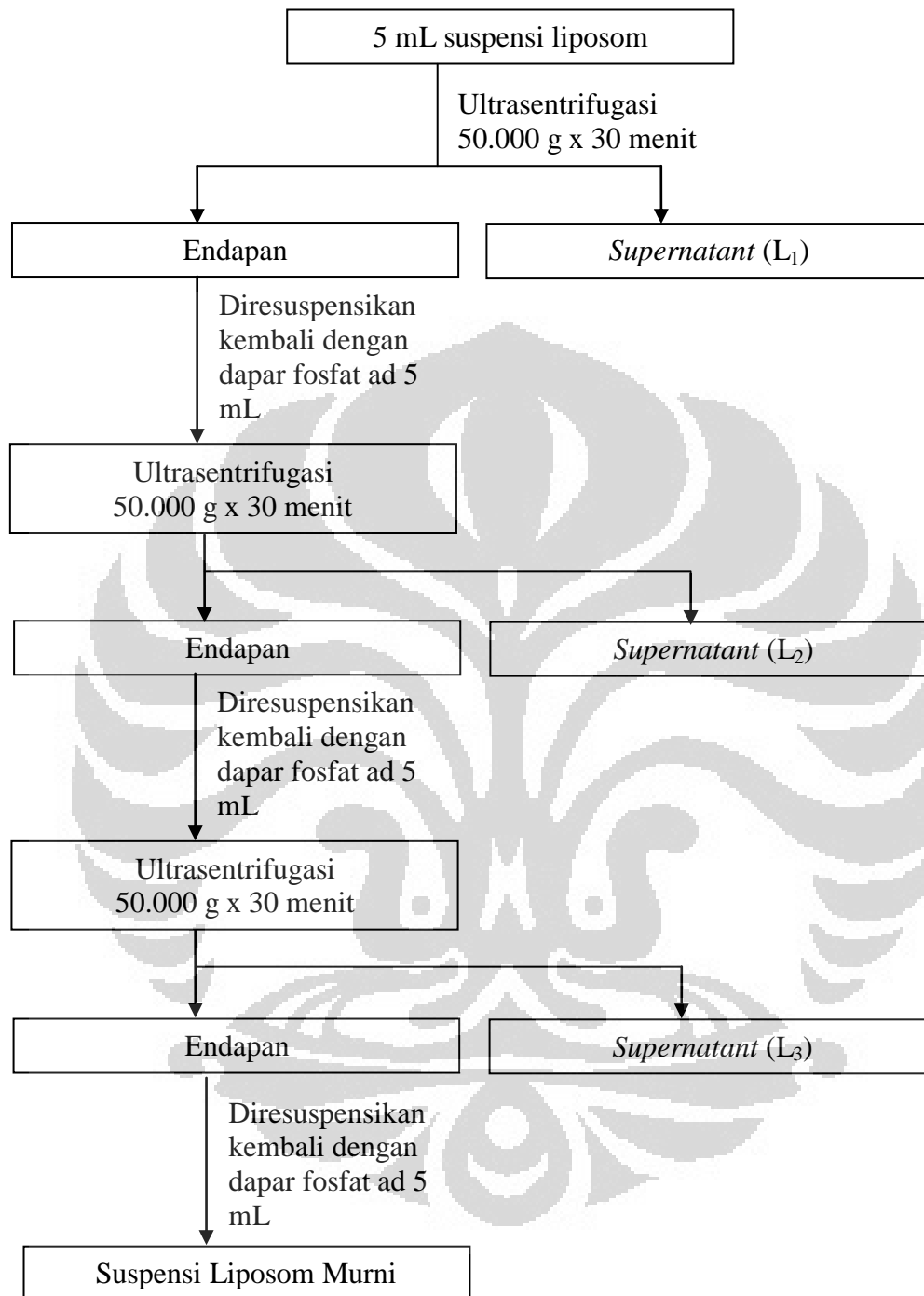
Keterangan :
 KK (A) = Kontrol Kuman *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 KK (B) = Kontrol Kuman *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 KL(A) = Kontrol Suspensi Liposom Kosong dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
 KL(B) = Kontrol Suspensi Liposom Kosong dengan Bakteri *Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa*
 KLG = Kontrol Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat



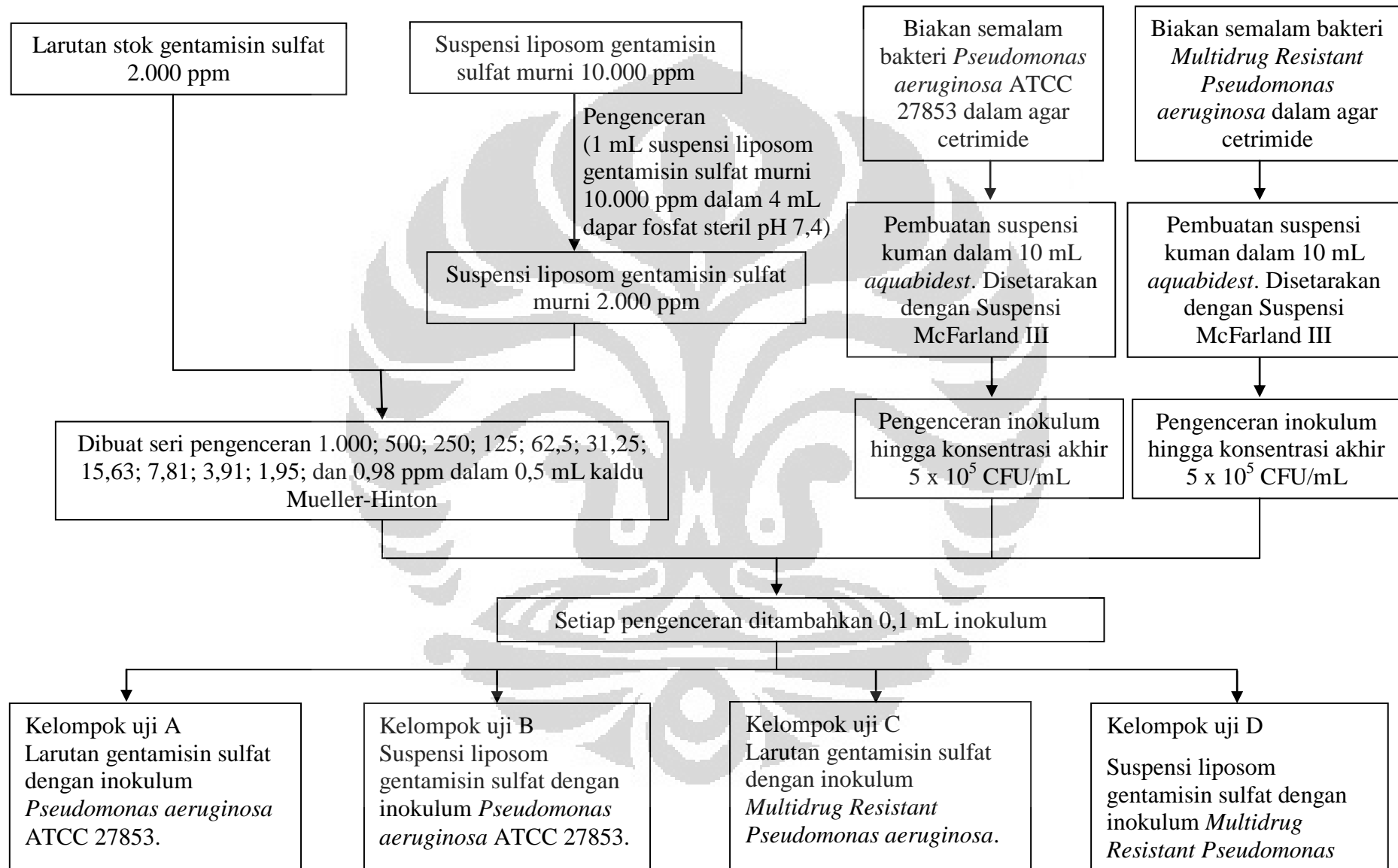
LAMPIRAN

Lampiran 3.1. Diagram Alur Pembuatan Liposom

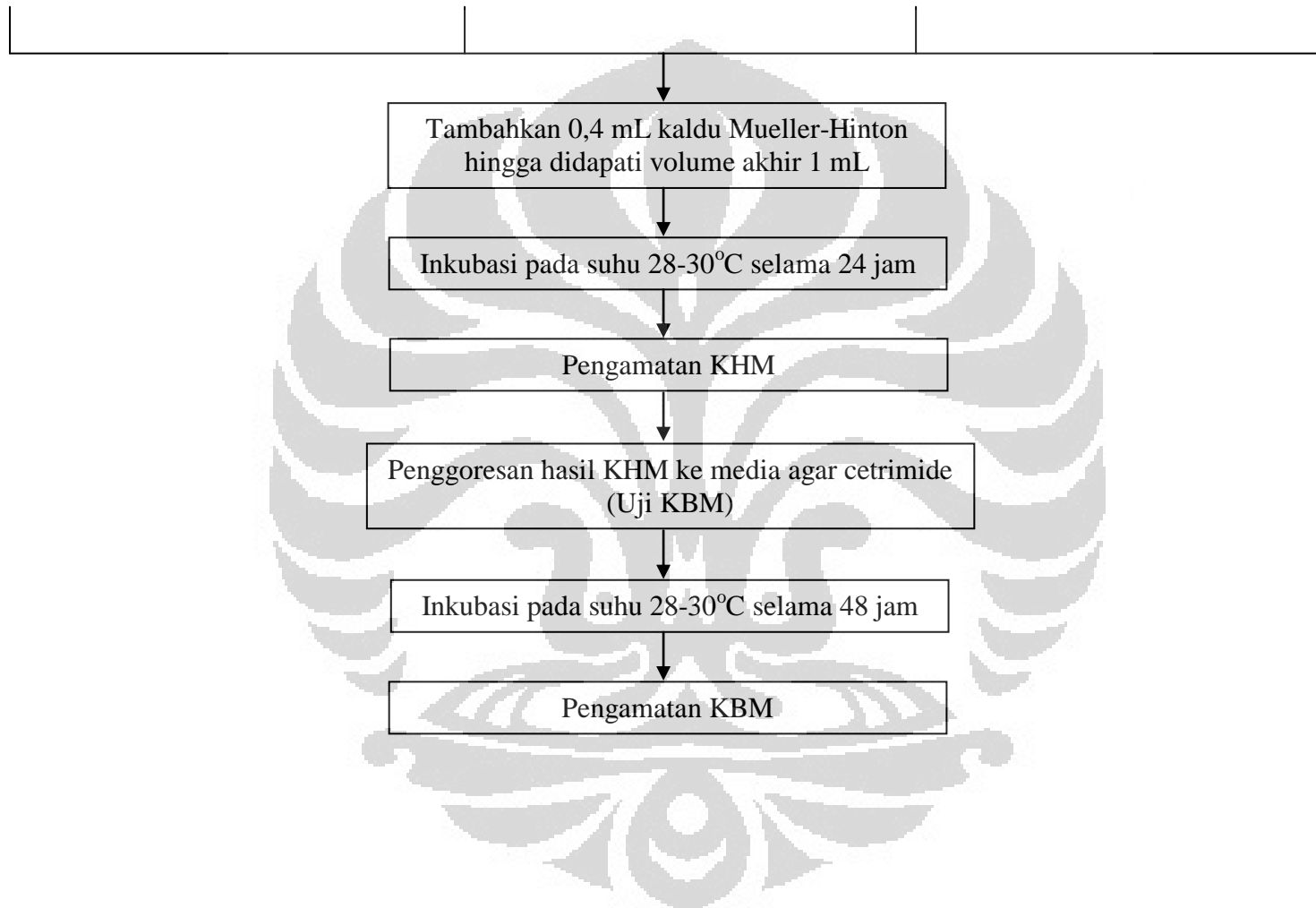


Lampiran 3.2. Diagram Alur Pemurnian Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat

Lampiran 3.3. Diagram Alur Pengujian Aktivitas Antibakteri



Lanjutan Lampiran 3.3. Diagram Alur Pengujian Aktivitas Antibakteri



Lampiran 3.4. Sertifikat Analisis Fosfatidilkolin

SIGMA-ALDRICH®

SIGMA
Life Science
Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland
Tel: +41 81 756 2511 Fax: +41 81 756 5449

Certificate of Analysis

Product Name: L- α -PHOSPHATIDYLCHOLINE
from egg yolk, ~ 60 % TLC

Product Number: 61755

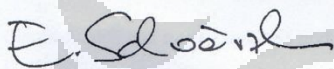
Product Brand: Sigma

Molecular Formula:

Molecular Mass:

CAS Number: 8002-43-5

TEST	SPECIFICATION	LOT BCB3767 RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	YELLOW TO ORANGE	ORANGE
APPEARANCE (FORM)	POWDER TO SOLIDIFIED MASS OR CHUNKS	SOLIDIFIED MASS OR CHUNKS
PURITY (TLC AREA %)	$\geq 55.0 \%$	76.5 %
WATER	$\leq 2.0 \%$	0.7 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
QC RELEASE DATE	15/OCT/10	


Edeltraud Schwärzler, Manager
Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

Lampiran 3.5. Sertifikat Analisis Kolesterol

SIGMA-ALDRICH		3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA Website: www.sigmaldrich.com Email USA techserv@sial.com Outside USA eurtechserv@sial.com
Certificate of Origin		
Product Name:	Cholesterol	
	94 %	
Product Number:	C75209	
Product Brand:	Sigma	
Lot:	STBB5512	
Molecular Formula:	C ₂₇ H ₄₆ O	
Molecular Mass:	386.65	
CAS Number:	57-88-5	
Date of Issue:	15-JUN-10	
Last Update:	08-JUL-11	
Country of Origin	Japan	
product is of synthetic origin		no
only synthetic materials used in the manufacturing process		no
compounds of animal origin used		yes
genetically modified organisms used		no
allergenic materials used		no
procedures in place to avoid cross contamination with residue of animal, human, GMO or allergenes in manufacturing process		yes
Sigma-Aldrich has quality systems and procedures in place for monitoring the production process, traceability and batch consistency.		
Document issued by Sigma-Aldrich Corporation "Sigma-Aldrich". This document is valid without signature and has been produced digitally.		
This information is to be used for the purpose of determining animal or other biological origin only and not to be confused with "Country of Origin" for import/export purposes. Data provided on this document are property of Sigma-Aldrich.		
This information is considered accurate and reliable as of the date appearing on the document and is presented in good faith.		
Sigma-Aldrich shall not be held liable for any damage resulting from handling or from processing the above product(s). This document does not make any warranty, express or implied, of fitness for any particular use of the product(s). Purchaser must determine the suitability of the product(s) for its use under the applicable law and regulations.		
For further questions please contact your local Sigma-Aldrich representative.		
<i>We are committed to the success of our Customers, Employees and Shareholders through leadership in Life Science, High Technology and Service.</i>		
Sigma-Aldrich	Certificate of Origin - Product C75209 Lot STBB5512	Page 1 of 1

SIGMA-ALDRICH®**SIGMA**
LIFE SCIENCERiedstrasse 2, D-89555 Steinheim/Germany
Tel: +49 73 2997 2550 Fax: +49 73 2997 2557**Certificate of Analysis**

Product Name: CHOLESTEROL
95 %
Product Number: C75209
Product Brand: Sigma
Molecular Formula: C₂₇H₄₆O
Molecular Mass: 386.65
CAS Number: 57-88-5

TEST	SPECIFICATION	LOT STBB5512 RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (GC AREA %)	≥ 94.0 %	94.1 %
OPTICAL ROTATION	-39 ± 6 DEGREES	-37 DEGREES
CONCENTRATION	C=2% DIOXANE	2% IN DIOXAN
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO PALE YELLOW	COLORLESS
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO SLIGHTLY HAZY	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	1G/4.5ML, CHCL3	1G/4.5ML, CHCL3
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
QC RELEASE DATE	22/JUN/10	

Claudia Mayer


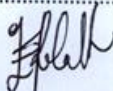
Claudia Mayer, Manager
Quality Control
Steinheim, Germany

Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

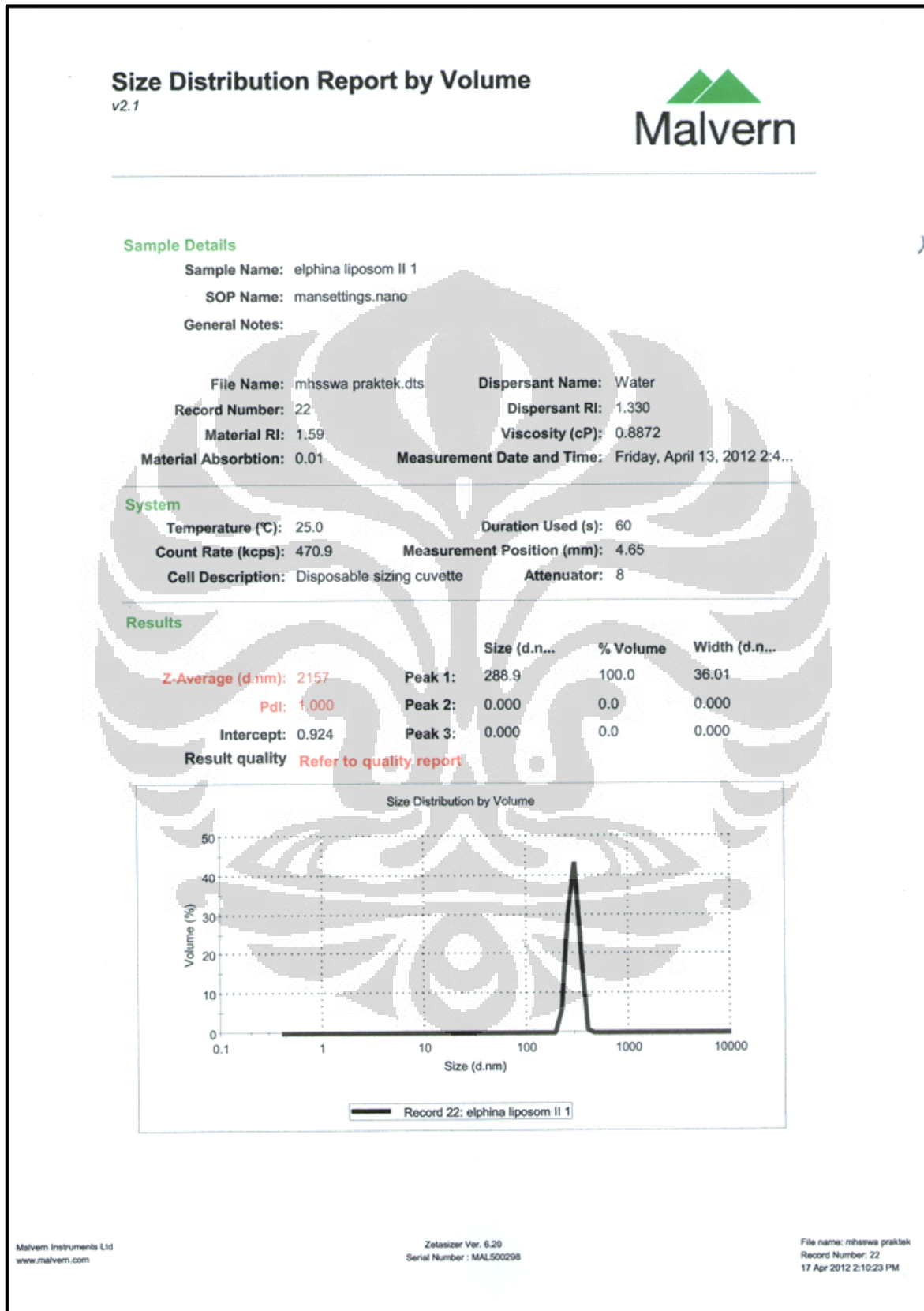
Lampiran 3.6. Sertifikat Analisis Gentamisin Sulfat

FUJIAN FUKANG PHARMACEUTICAL CO.,LTD.		
GENTAMICIN SULPHATE		
CERTIFICATE OF ANALYSIS		
BATCH NO.	1008306	MANUFACTURE DATE 20 AUG. 2010
REPORT DATE	21 AUG. 2010	EXPIRY DATE AUG. 2014
TOTAL	103 KG BASE	SPECIFICATIONS EP 6.0
PACKING AND QUANTITY 3 KG BASE/TIN x 1 TIN, 5 KG BASE/TIN x 20 TINS		
TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS
CHARACTERS	A white or almost white, hygroscopic powder, freely soluble in water, practically insoluble in alcohol.	White
IDENTIFICATION C	The chromatogram obtained with the test solution shows 5 principal peaks having the same retention times as the 5 principal peaks in the chromatogram obtained with reference solution (a).	Passes test
IDENTIFICATION D	It gives reaction (a) of sulphates	Passes test
APPEARANCE OF SOLUTION	The solution is clear and not more intensely colored than degree 6 of reference solution.	Passes test
pH	3.5 to 5.5 (50 mg/ml solution)	4.7
SPECIFIC OPTICAL ROTATION (ANHYDROUS SUBSTANCE)	+107° to +121°	+118°
COMPOSITION:		
GENTAMICIN C1	20.0% to 26.0%	28.7%
GENTAMICIN C1a	10.0% to 50.0%	22.9%
GENTAMICIN C2+C2a+C2b	40.0% to 50.0%	48.3%
RELATED SUBSTANCES:		
ANY IMPURITY	Not more than 3.0%	1.5%
TOTAL	Not more than 10.0%	1.5%
METHANOL	Not more than 1.0%	Not tested *
SULPHATE (ANHYDROUS SUBSTANCE)	32.0% to 36.0%	33.8%
WATER	Not more than 18.0%	9.0%
SULPHATED ASH	Not more than 1.0%	0.1%
BACTERIAL ENDOTOXINS ASSAY (ANHYDROUS SUBSTANCE)	Less than 0.71 I.U./mg	<0.06 I.U./mg
	Not less than 590 I.U./mg	664 I.U./mg
*Remark: No methanol is used during the production.		
CONCLUSION: THE SUBJECT BATCH COMPLIES WITH EP 6.0.		

Lampiran 3.7. Surat Bukti Penerimaan Isolat Bakteri dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

	UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN DEPARTEMEN MIKROBIOLOGI (Department of Microbiology, Medical Faculty, University of Indonesia) Jl. Pegangsaan Timur 16 JAKARTA 10320 - INDONESIA Telp. 31922850 - 3100806 - 3160491 - 92 Fax : (062) - 21 - 3100810 E-mail : microb_fkui@cbn.net.id
	<hr/>
FORMULIR PERJANJIAN PENGGUNAAN MIKROBA DEPARTEMEN MIKROBIOLOGI FKUI	
NAMA	: Elphina Rolanda
INSTITUSI	: Farmasi UI
ALAMAT	: Depok
Telah menerima Bakteri/Jamur/Virus:	
1.	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
2.	Isolat Multi-Drug Resistant Pseudomonas aeruginosa
3.	
Dari Departemen Mikrobiologi FKUI Jakarta, dengan tujuan:	
Penelitian Skripsi	
Berjanji bahwa :	
1. Tidak akan digunakan untuk tujuan komersial 2. Tidak akan diserahkan kepada pihak ketiga tanpa persetujuan dari Departemen Mikrobiologi FKUI 3. Tidak akan disalahgunakan sehingga dapat merugikan masyarakat 4. Sumber mikroba tersebut di atas harus dituliskan pada publikasi ilmiah yang akan dipresentasikan/diterbitkan.	
Apabila perjanjian penggunaan mikroba tersebut di atas disalahgunakan/dilanggar maka akan dikenakan sanksi berupa tidak dapat lagi memperoleh galur mikroba dan nama yang bersangkutan akan diedarkan kesemua senter koleksi biakan mikroba di Indonesia dan peraturan lain yang berlaku di Indonesia.	
Jakarta, 28 Februari 2012	
 Elphina Rolanda Nama Jelas	

Lampiran 4.1. Hasil Pemeriksaan Distribusi Ukuran Partikel Suspensi Liposom Kosong



Lampiran 4.2. Hasil Pemeriksaan Distribusi Ukuran Partikel Suspensi Liposom Gentamisin Sulfat

