



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PENAMBAHAN ASAM PALMITAT TERHADAP
SENSITIVITAS LIPOSOM SPIRAMISIN PADA BERBAGAI
KONDISI pH**

SKRIPSI

**NAYLA KURROTA AKYUN
0806398505**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PENAMBAHAN ASAM PALMITAT TERHADAP
SENSITIVITAS LIPOSOM SPIRAMISIN PADA BERBAGAI
KONDISI pH**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Farmasi**

**NAYLA KURROTA AKYUN
0806398505**

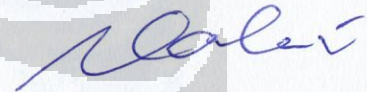
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

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



Nayla Kurrota Akyun

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Nayla Kurrota Akyun

NPM : 0806398505




Tanda Tangan : 

Tanggal : 9 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Nayla Kurrota Akyun
NPM : 0806398505
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Pengaruh Penambahan Asam Palmitat terhadap
Sensitivitas Liposom Spiramisin pada Berbagai
Kondisi pH

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Iskandarsyah, M.S, Apt ()
Penguji I : Dr. Mahdi Jufri, M.Si.. ()
Penguji II : Dr. Harmita, Apt. ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 9 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

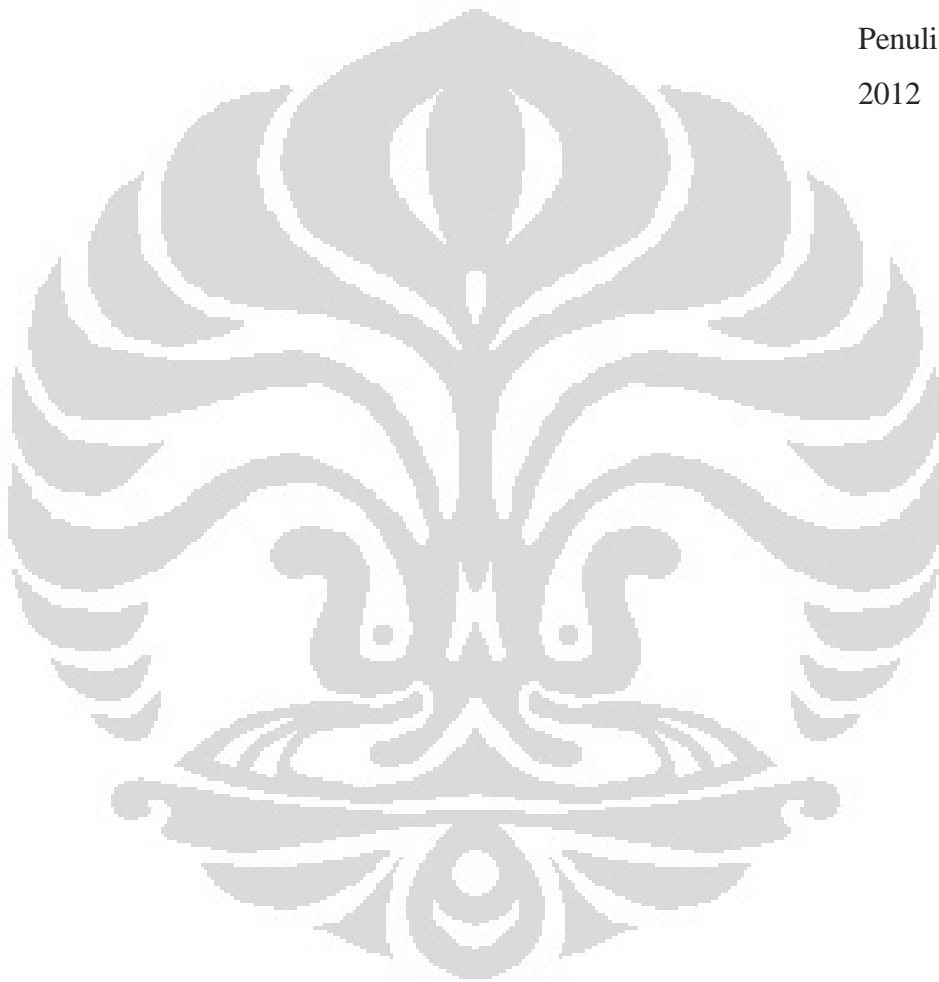
Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan, bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi, sangatlah sulit untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Iskandarsyah, M.S., Apt., selaku dosen pembimbing yang dengan sabar membimbing dan mengarahkan, memberikan bantuan, nasehat, dan perhatian, serta dukungan moril selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., Apt., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini;
3. Prof. Dr. Endang Hanani Apt., M.S., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan banyak perhatian, saran dan bantuan selama masa perkuliahan;
4. Sutriyo, M.Si., Apt., selaku ketua Laboratorium Farmasetika serta seluruh Bapak dan Ibu Dosen Farmasi UI yang telah banyak membantu dan membimbing penulis selama masa pendidikan hingga penelitian.
5. Bapak/Ibu laboran dan karyawan Farmasi UI terutama Mbak Devfanny dan Bapak Imih atas semua bantuan yang diberikan selama penelitian berlangsung.
6. Ayah, Ibu, kakak serta adikku tercinta yang telah memberi bantuan dukungan baik moril maupun materil selama ini.
7. Semua pihak yang telah memberikan bantuan, bimbingan, dan pengarahan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan dorongan semangat, bantuan, bimbingan dan arahan selama penelitian dan penyusunan skripsi.

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 : Nayla Kurrota Akyun
NPM : 0806398505
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

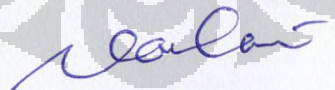
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Pengaruh Penambahan Asam Palmitat terhadap Sensitivitas Liposom Spiramisin pada Berbagai Kondisi pH

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



(Nayla Kurrota Akyun)

ABSTRAK

Nama : Nayla Kurrota Akyun
Program Studi : Farmasi
Judul : Pengaruh Penambahan Asam Palmitat terhadap Sensitivitas Liposom Spiramisin pada Berbagai Kondisi pH

Liposom sebagai sistem penghantaran obat dapat mengurangi efek samping dan toksisitas obat karena membantu menargetkan obat ke targetnya secara spesifik. Pada daerah yang terinfeksi biasanya bersifat asam, oleh karena itu perlu dibuat liposom sensitif pH. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan asam palmitat terhadap sensitivitas liposom yang mengandung spiramisin pada berbagai kondisi pH dan mengevaluasi kemampuan penjerapannya. Pada penelitian ini dibuat tiga formulasi yaitu tanpa penambahan asam palmitat, dengan penambahan satu mol asam palmitat dan penambahan dua mol asam palmitat. Liposom dievaluasi bentuk dan morfologinya menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) serta diamati distribusi ukuran partikelnya dengan *Particle Size Analyzer* (PSA), persentase penjerapan yang diperoleh dari hasil ultrasentrifugasi dan yang utama adalah sensitivitas liposom pada pH 2; pH 5,5; dan pH 8. Hasil yang didapat adalah liposom dengan rentang diameter 100-200 nm dan efisiensi penjerapan dari ketiga formula menurun dengan meningkatnya konsentrasi asam palmitat. Efisiensi penjerapan dari ketiga formula menurun dengan meningkatnya konsentrasi asam palmitat. Kemampuan penjerapan liposom sensitif pH yaitu 82,22% dan 81,94%. Pelepasan obat tertinggi didapat pada liposom medium pH 2 dan terendah pada medium pH 8.

Kata Kunci : sistem penghantaran obat, liposom, liposom sensitif pH, asam palmitat, spiramisin, pentargetan obat
xv+ 70 halaman : 15 gambar; 1 tabel; 30 lampiran
Daftar acuan : 41 (1979-2011)

ABSTRACT

Name : Nayla Kurrota Akyun
Program Study : Pharmacy
Title : Role of Palmitic Acid to The Sensitivity of Liposomal Spiramycin at Different pH Conditions

Liposomes as drug carrier in order to reduce adverse effects and toxicity of drugs because applied for drug targeting specifically. In the infection area usually in acidic condition so it is so important to make pH sensitive liposome. The aims of this research are to study about the presence of palmitic acid in liposome formula containing spiramycin on their pH sensitivity and to evaluate their entrapping efficiency. There are three concentrations of palmitic acid that use in liposome formula which are 1 mol, and 2 mol. Liposomes were evaluated by their morphology with *Scanning Electron Microscopy* (SEM), particle size distribution with *Particle Size Analyzer* (PSA), entrapment efficiency with ultracentrifugation, and their sensitivity in pH 2; 5.5; and 8 medium. Evaluation results showed that liposomes particle sizes are range from 100-200 nm, and it illustrated that the higher palmitic acid concentration gave the lower their entrapment efficiency. The pH sensitive liposome has entrapment efficiency 82.22% and 81.94%. The highest drug released could be obtained from liposomes in pH 2 medium while the lowest drug released was in pH 8 medium.

Keywords : Drug carrier, liposome, palmitic acid, pH sensitive liposome, spiramycin, targeting
xv+ 70 pages : 15 figures; 1 tables; 30 appendixes
References : 41 (1979-2011)

DAFTAR ISI

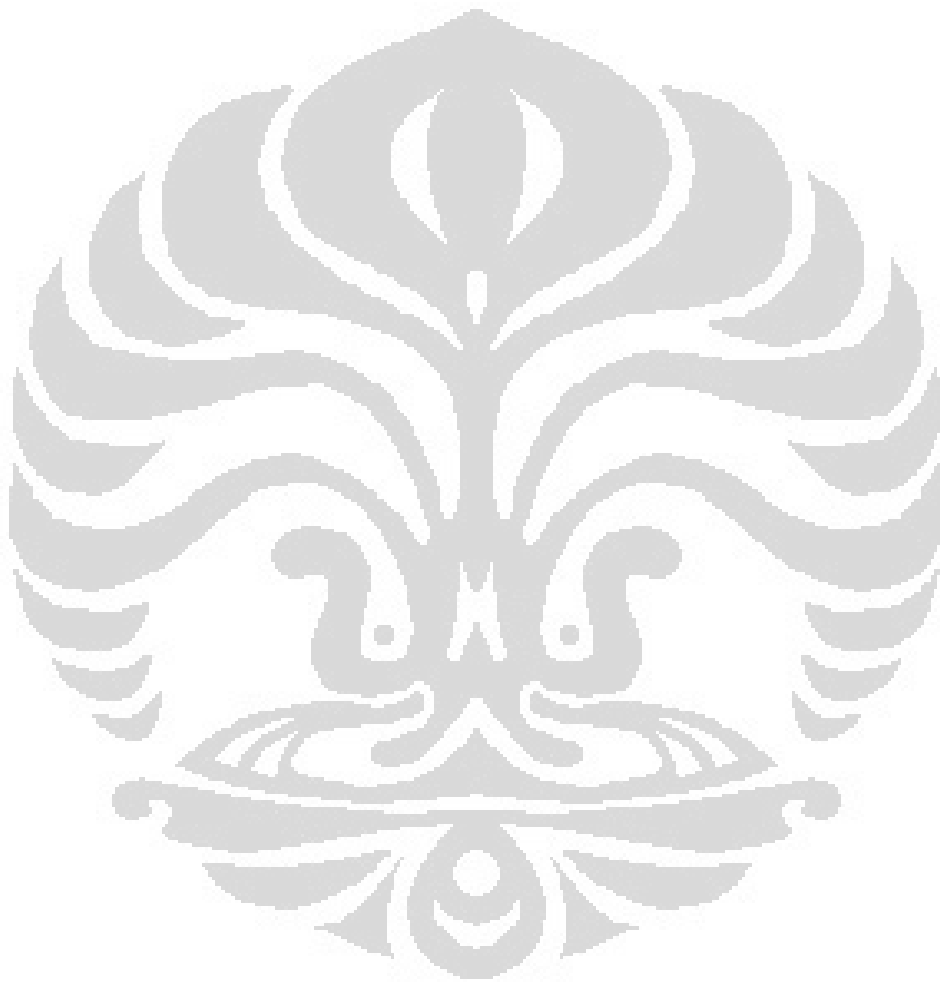
HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Liposom.....	3
2.2 Fosfatidilkolin.....	17
2.3 Kolesterol.....	18
2.4 Spiramisin.....	18
2.5 Asam Palmitat	19
BAB 3. METODE PENELITIAN	20
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	20
3.2 Bahan.....	20
3.3 Alat	21
3.4 Cara Kerja.....	21
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	26
4.1 Pembuatan Liposom Sensitif pH.....	26
4.2 Pengecilan Ukuran Partikel	28
4.3 Pemurnian Liposom.....	28
4.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi Spiramisin.....	29
4.5 Evaluasi Liposom Sensitif pH	30
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1 Kesimpulan	40
5.2 Saran	40
DAFTAR ACUAN	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Pembuatan lipid dengan metode hidrasi	8
Gambar 2.2	Mekanisme pecahnya liposom oleh ultrasonikasi	9
Gambar 2.3	Pembentukan liposom berdasarkan teori <i>budding off</i>	10
Gambar 2.4	Mekanisme destabilisasi liposom sensitif pH	16
Gambar 2.5	Struktur kimia dari fosfatidilkolin	17
Gambar 2.6	Struktur kimia kolesterol	18
Gambar 2.7	Struktur kimia spiramisin	18
Gambar 4.1	Morfologi liposom formula 2 hasil pengukuran dengan <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM) dengan <i>digital zoom</i> 6000x.....	31
Gambar 4.2	Diagram rata-rata distribusi ukuran partikel liposom hasil pengukuran dengan <i>Particle Size Analyzer</i>	32
Gambar 4.3	Grafik distribusi ukuran partikel liposom formula 2 setelah ultrasonikasi 40 menit hasil pengukuran dengan PSA	33
Gambar 4.4	Grafik distribusi ukuran partikel liposom formula 3 setelah ultrasonikasi 40 menit hasil pengukuran dengan PSA	34
Gambar 4.5	Diagram persentase efisiensi penyerapan spiramisin oleh liposom	35
Gambar 4.6	Grafik persentase pelepasan spiramisin dari liposom formula 2 selama 8 jam	37
Gambar 4.7	Grafik hubungan pH medium dengan persentase pelepasan spiramisin selama 8 jam dari ketiga formula liposom.	38
Gambar 4.8	Grafik hubungan konsentrasi asam palmitat yang ditambahkan dengan persentase pelepasan obat selama 8 jam pada tiga kondisi pH.....	39

DAFTAR TABEL

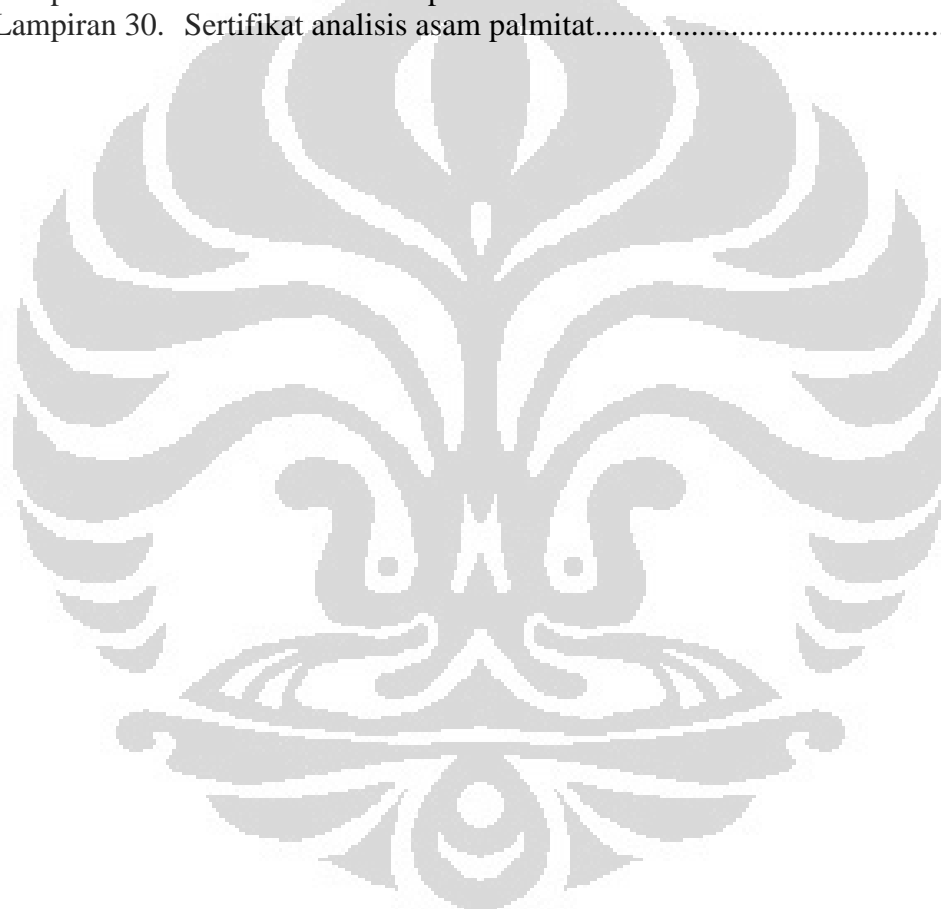
Tabel 3.1 Formulasi liposom sensitif pH	22
---	----



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Spektrum serapan spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 pada konsentrasi 3 µg/ml.....	47
Lampiran 2.	Kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 pada panjang gelombang 231,5 nm.....	47
Lampiran 3.	Spektrum serapan spiramisin dalam larutan dapar klorida pH 2 pada konsentrasi 3 µg/ml.....	48
Lampiran 4.	Kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar klorida pH 2 pada panjang gelombang 231,5 nm.....	48
Lampiran 5.	Spektrum serapan spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 5,5 pada konsentrasi 3 µg/ml.....	49
Lampiran 6.	Kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 5,5 pada panjang gelombang 231,5 nm.....	49
Lampiran 7.	Spektrum serapan spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 8 pada konsentrasi 3 µg/ml.....	50
Lampiran 8.	Kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 8 pada panjang gelombang 231,5 nm.....	50
Lampiran 9.	Penampilan suspensi liposom (a) sebelum diultrasonikasi dan (b) setelah diultrasonikasi selama 40 menit.....	51
Lampiran 10.	Morfologi liposom (a) formula 1, (b) formula 2, dan (b) formula 3 setelah diultrasonikasi 40 menit, hasil pengukuran dengan SEM digital zoom 6000x.	52
Lampiran 11.	Hasil pengukuran <i>Particle Size Analyzer</i> formula 1 (a) sebelum diultrasonikasi (b) setelah diultrasonikasi 40 menit.....	54
Lampiran 12.	Hasil pengukuran <i>Particle Size Analyzer</i> formula 2 (a) sebelum diultrasonikasi (b) setelah diultrasonikasi 40 menit.....	55
Lampiran 13.	Hasil pengukuran <i>Particle Size Analyzer</i> formula 3 (a) sebelum diultrasonikasi (b) setelah diultrasonikasi 40 menit.....	56
Lampiran 14.	Grafik persentase pelepasan spiramisin dari liposom formula 1 selama 8 jam.....	57
Lampiran 15.	Grafik persentase pelepasan spiramisin dari liposom formula 2 selama 8 jam.....	57
Lampiran 16.	Grafik persentase pelepasan spiramisin dari liposom formula 3 selama 8 jam.....	58
Lampiran 17.	Data konsentrasi dan serapan kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar pH 7,4.....	59
Lampiran 18.	Data konsentrasi dan serapan kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar pH 2.....	59
Lampiran 19.	Data konsentrasi dan serapan kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar pH 5,5.....	60
Lampiran 20.	Data konsentrasi dan serapan kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar pH 8.....	60
Lampiran 21.	Data hasil evaluasi pelepasan spiramisin pada pH 2.....	61

Lampiran 22. Data hasil evaluasi pelepasan spiramisin pada pH 5,5.....	62
Lampiran 23. Data hasil evaluasi pelepasan spiramisin pada pH 8.....	63
Lampiran 24. Skema pembuatan liposom menggunakan metode hidrasi lapis tipis.....	64
Lampiran 25. Contoh perhitungan efisiensi penyerapan spiramisin Formula 1.....	65
Lampiran 26. Contoh perhitungan persen pelepasan obat pada uji sensitivitas di pH 5,5 Formula 1 saat jam pertama (menit ke-15).....	66
Lampiran 27. Sertifikat analisis <i>egg</i> fosfatidilkolin.....	67
Lampiran 28. Sertifikat analisis kolesterol.....	68
Lampiran 29. Sertifikat analisis spiramisin.....	69
Lampiran 30. Sertifikat analisis asam palmitat.....	70



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dalam penghantaran mencapai tempat kerjanya, obat seringkali menemui hambatan atau gangguan sehingga mengurangi khasiat dari obat tersebut. Adanya toksisitas dan efek samping obat juga dapat diakibatkan terdistribusinya obat ke jaringan lain selain target atau reseptornya. Oleh karena itu, diperlukan suatu sistem penghantaran obat (*drug delivery systems*) yang dikembangkan untuk membawa obat langsung ke target sehingga obat tidak terdistribusi ke jaringan lain dan dapat menurunkan efek samping obat (Kaparissides, Alexandridou, Kotti, & Chaitidou, 2006).

Salah satu vesikel pembawa obat yang telah dikembangkan adalah liposom yaitu suatu vesikel yang tersusun dari lipid lapis ganda. Liposom telah digunakan sebagai pembawa obat-obat antiinflamasi, antibakteri, obat-obat tumor, terapi gen, dan lainnya. Sebagai pembawa obat-obat ke jaringan inflamasi, jaringan tumor, ataupun yang terinfeksi oleh bakteri atau virus (Zignani, Drummond, Meyer, Hong, dan Leroux, 1999), pengembangan liposom diharapkan dapat meningkatkan penghantaran dan pelepasan obat.

Liposom dipandang sebagai sistem pembawa yang efisien dan spesifik serta dapat menghantarkan obat langsung ke sel target (Benita, 1996). Sebagai sistem pembawa obat, liposom dapat melindungi obat selama perjalanan ke target organ sehingga tidak merusak organ lain yang sehat, dapat menekan dosis obat, mengurangi efek samping serta mengubah farmakokinetik obat sehingga dapat memberikan indeks terapi yang lebih baik (Kurkani, Singh, Betagent, 1997).

Untuk memaksimalkan fungsinya sebagai sistem penghantaran obat, liposom haruslah stabil. Namun, meskipun sifat kestabilan yang tinggi diperlukan, liposom juga harus dapat melepaskan kandungan zat aktifnya secara efisien ke reseptor, sel, ataupun jaringan yang menjadi sasaran (Wu, Zhao, & Lee, 2007).

Formulasi liposom dengan kandungan obat seperti doxorubisin telah dimanfaatkan untuk penghantaran obat antitumor dan antifungi sistemik. Telah dilakukan penelitian terhadap liposom antibiotik golongan makrolida seperti azitromisin dan klaritromisin terhadap bakteri patogen intraselular yang

menunjukkan peningkatan efisiensi antibakteri dibandingkan dengan obat bebas (Drulis-Kawa dan Dorotkiewicz-Jach, 2009).

Sejak diketahui bahwa beberapa jaringan yang rusak atau pada tumor memiliki lingkungan dengan pH yang cukup rendah atau asam, maka perkembangan sistem penghantaran obat dengan sistem liposom juga mengikuti teknik sensitif terhadap pH. Hal ini didukung setelah dilakukan pengukuran pH ekstraseluler yang diukur oleh elektroda pada beberapa jenis dari tumor manusia yang diketahui pH di lingkungan ekstraseluler tersebut lebih rendah dibandingkan pada jaringan yang sehat dan normal (Torchillin, Lukyanov, dan Klibanov, 1992). Liposom jenis ini dikenal sebagai liposom sensitif pH. Liposom melebur dengan membran sel atau membran endosom, mengalami endositosis dan akan melepaskan kandungan zat aktifnya pada kondisi pH yang rendah di sitoplasma. Oleh karena itu, digunakan suatu agen penginduksi yang dapat menginduksi pelepasan liposom pada pH yang lebih rendah. Pada penelitian ini akan digunakan asam palmitat sebagai agen penginduksi pelepasan liposom pada pH yang lebih rendah (Cui, Bastiat, Jin, Keyvanloo, Lafleur, 2010) sehingga nantinya dapat melepaskan obat ke target yang dituju.

Dalam penelitian ini juga digunakan spiramisin sebagai model obat karena antibiotik makrolida lain seperti spiramisin belum banyak diteliti dalam penghantaran obat tertarget khususnya dalam bentuk liposom. Selain itu, spiramisin merupakan model obat yang cocok untuk liposom sensitif pH karena merupakan makromolekuler dan bersifat basa lemah.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui pengaruh penambahan konsentrasi asam palmitat terhadap sensitivitas liposom yang mengandung spiramisin pada berbagai kondisi pH.
2. Mengevaluasi kemampuan penjerapan liposom yang mengandung spiramisin.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Liposom

Liposom adalah mikropartikel yang memiliki rentang ukuran 0,03-0,1 μm , terdiri dari dua lapis fosfolipid yang mengenkapsulasi fase air. Berikut ini beberapa definisi dari liposom:

- a. Liposom adalah kantung lipid yang tertutup dan dalam rentang mikron dan submicron terdispersi dalam suatu lingkungan yang berair (Barenholz & Crommelin, 1994).
- b. Liposom adalah membran *phospholipid* bilayer dengan volume cairan yang terperap di dalamnya (Wu, Zhao, & Lee, 2007).
- c. Liposom adalah vesikel mikroskopik sederhana di mana terdapat struktur lipid *bilayer* dengan volume cairan yang terkurung di dalam membran (Biju, Talegaonkar, Mishra, & Khar, 2006).

Liposom dapat digunakan sebagai sistem penghantaran obat dengan rute intravena, intramuskular, intraperitoneal, dan oral, namun intravena adalah rute yang lebih sering digunakan. Berdasarkan Gregoriadis (1984), liposom telah diaplikasikan sebagai pembawa beberapa obat seperti antineoplastik, antimikroba, dan imunomodulator. Liposom juga telah digunakan untuk penghantaran obat dalam untuk infeksi intraseluler.

Liposom memiliki banyak kelebihan dalam sistem penghantaran obat. Ketika diberikan secara parenteral, baik secara intravena, subkutan, maupun intramuskular, liposom dapat melindungi obat dari proses degradasi dan mengendalikan pelepasan obat yang terperap di dalamnya. Dengan demikian liposom dapat mengurangi efek samping obat dengan mengendalikan pelepasan obat bebas yang tersedia dalam aliran darah. Liposom juga dapat membatasi paparan obat tertentu terhadap jaringan tubuh. Kelebihan karakteristik farmasetik dan farmakologi dari liposom adalah (Barenholz & Crommelin, 1994):

- a. Liposom memiliki bagian lipofilik dan hidrofilik dalam satu sistem sehingga dapat digunakan sebagai pembawa obat-obat atau molekul yang bersifat baik hidrofobik, amfipatik, maupun hidrofilik.
- b. Liposom telah terkarakterisasi dengan baik, secara fisik dan kimia.

- c. Kondisi liposom secara biologis dipengaruhi oleh komposisi dan sifat fisiknya.
- d. Liposom bersifat biokompatibel karena kemampuan biodegradasinya, toksisitas yang rendah dan reaksi imunogenisitas yang jarang terjadi.
- e. Liposom dapat digunakan sebagai pembawa obat yang pelepasannya terkontrol di dalam cairan tubuh dan di dalam sel.
- f. Penggunaan liposom dapat mengurangi resiko paparan obat toksik pada jaringan yang sensitif.
- g. Liposom dapat diberikan melalui beberapa rute pemberian, termasuk *ocular*, *pulmonary*, nasal, oral, intramuskular, subkutan, topikal, dan intravena.

Farmakokinetik dan biodistribusi liposom secara *in vivo* dapat diatur oleh komposisi lipid dan ukuran liposom.

2.1.1 Klasifikasi Liposom

Liposom dapat diklasifikasikan dengan beberapa cara. Berdasarkan jumlah lapisan dan diameter, liposom dapat dikelompokkan menjadi *multi lamellar vesicles* (MLV's) dengan diameter >200 nm, *large unilamellar vesicles* (LUV's) dengan diameter 100-400 nm, dan *small unilamellar vesicles* (SUV's) dengan diameter <100 nm. Berdasarkan muatannya liposom diklasifikasikan menjadi liposom kationik, liposom anionik, dan liposom netral (Wu, Zhao, & Lee, 2007). Berdasarkan bahan penyusun dan model penghantaran obatnya, liposom diklasifikasikan dalam tujuh jenis yaitu (Biju, Talegaonkar, Mishra, & Khar, 2006):

2.1.1.1 Liposom Konvensional

Bahan penyusun liposom konvensional terdiri dari fosfolipid bermuatan netral ataupun bermuatan negatif dan kombinasi dengan kolesterol. Liposom dapat digunakan untuk penargetan pada retikulum endoplasma (RES). Karakteristik yang ditunjukkan yaitu memiliki waktu paruh sirkulasi yang pendek.

2.1.1.2 Liposom Sensitif pH

Liposom jenis ini menggunakan fosfatidiletanolamin atau dioleil fosfatidiletanolamin, dikombinasi dengan kolesterol hemisuksinat atau asam oleat sebagai bahan penyusunnya. Liposom melebur dengan membran sel atau

membran endosom, mengalami endositosis dan akan melepaskan kandungan zat aktifnya pada kondisi pH yang rendah di sitoplasma. Liposom jenis ini dapat digunakan sebagai pembawa obat yang bersifat basa lemah dan obat-obat makromolekular.

2.1.1.3 Liposom Kationik

Liposom kationik menggunakan lipid yang bermuatan positif seperti dioleiloksipropil trimetilamonium bromida (DOTMA). Liposom jenis ini dapat melebur dengan membran endosom, digunakan untuk penghantaran molekul-molekul yang bermuatan negatif (DNA dan RNA), bersifat toksik pada dosis yang tinggi, dan penggunaannya terbatas hanya untuk pemberian lokal.

2.1.1.4 Liposom Sirkulasi Panjang (*Stealth Liposome*)

Liposom jenis ini pada permukaannya disalut oleh komponen hidrofilik. Bahan penyusun yang digunakan adalah lipid diantaranya bermuatan netral yang memiliki suhu transisi yang tinggi, kolesterol yang bermuatan positif, dan liposom yang ditempelkan 5-10% polietilen glikol. Karakteristik yang ditunjukkan adalah opsonisasi yang rendah sehingga kecepatan pengambilan oleh sistem retikulum endoplasmanya rendah dan memiliki waktu paruh yang panjang (40 jam).

2.1.1.5 Imuno-liposom

Bahan penyusun liposom jenis ini sama seperti liposom konvensional atau liposom sirkulasi panjang, dengan ditempelkan sekuens antibodi atau sekuens lain yang sesuai. Liposom ini dapat digunakan sebagai mediasi reseptor endositosis, memiliki penargetan yang spesifik, dapat melepaskan kandungan terapeutiknya di jaringan target yang selanjutnya akan berdifusi melewati membran plasma.

2.1.1.6 Liposom Magnetik

Liposom jenis ini tersusun dari fosfatidilkolin, kolesterol, sejumlah kecil senyawa aldehyd rantai lurus, dan partikel magnetik koloid besi oksida. Pada permukaannya, terdapat tempat pengikatan untuk molekul lain seperti antibodi.

2.1.1.7 Liposom Sensitif Suhu

Jenis fosfolipid yang digunakan sebagai bahan penyusun liposom jenis ini adalah dipalmitoil fosfatidilkolin. Pelapasan bahan terapeutik dari liposom di sel

target berada pada kondisi suhu yang tinggi, dimana suhu tersebut merupakan suhu transisi dipalmitoil fosfatidilkolin tersebut.

2.1.2 Bahan Pembentuk Liposom (Barenholz & Crommelin, 1994)

Bahan yang digunakan sebagai penyusun liposom, yaitu fosfolipid, lipoprotein, merupakan bahan alami sehingga biokompatibel di dalam tubuh. Lipid penyusun liposom dapat berupa fosfolipid dan lipid golongan sterol seperti kolesterol. Fosfolipid, sebagai bahan utama penyusun liposom diklasifikasikan menjadi empat kelompok berdasarkan bahan penyusunnya:

2.1.2.1 Fosfolipid Alam

Fosfolipid alam didapat dari telur atau kedelai. Contoh dari fosfolipid alam adalah fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, sfingomielin (hanya berasal dari telur), fosfatidilinositol (hanya berasal dari kedelai). Fosfolipid yang berasal dari telur (fosfolipid hewan) memiliki rantai asil jenuh pada posisi 1 dan rantai asil tidak jenuh pada posisi 2. Fosfolipid tumbuhan memiliki rantai asil tidak jenuh pada posisi 1 dan 2 dengan asam linoleat sebagai komponen asil utama.

2.1.2.2 Fosfolipid Alam Termodifikasi

Fosfolipid alam dimodifikasi sebagian secara kimia, dengan cara hidrogenasi, untuk menurunkan derajat ketidakjenuhan fosfolipid. Hal tersebut dapat meningkatkan resistensinya terhadap peroksidasi. Selain hidrogenasi, modifikasi juga dapat dilakukan pada bagian polar pada fosfolipid dengan menggunakan enzim fosfolipase. Contoh dari modifikasi tersebut adalah fosfatidilgliserol yang mengalami transfosfatidilasi menjadi fosfatidilgliserol-fosfolipase D.

2.1.2.3 Fosfolipid Semisintetik dan Sintetik

Fosfolipid sintetik didapat dengan mengganti rantai alkil dari fosfolipid alam secara kimiawi. Fosfolipid sintetik diperoleh dengan cara reaksi kimiawi.

2.1.3 Pembuatan Liposom

Metode konvensional dalam pembuatan liposom dapat dikatakan melibatkan empat langkah yaitu pengeringan lipid dari pelarut organik, dispersi lipid di dalam media cair, pemurnian liposom yang dihasilkan serta reduksi ukuran partikel dan analisis produk akhir (Mozafari, 2005). Pelarut dihilangkan dengan menggunakan *rotary evaporator* yang kemudian akan membentuk lapisan tipis. Proses hidrasi dilakukan dengan mencampurkan fase air di atas suhu transisi dari fosfolipid dimana terjadi perubahan dari fase gel ke fase cair. Reduksi ukuran partikel dapat dilakukan dengan metode sonikasi, ekstrusi, homogenisasi atau homogenisasi tekanan tinggi (Biju, Talegaonkar, Mishra, dan Khar, 2006).

Proses penjerapan obat ke dalam liposom dilakukan bergantung pada polaritas obat. Obat yang larut dalam air dapat dimasukkan ke dalam fase air, dan obat yang larut dalam lipid dapat disisipkan ke dalam fosfolipid yang membentuk membran lapis ganda (Swarbrick, 2007). Berdasarkan proses penting pembuatan liposom, secara umum metode pembuatan liposom dibagi menjadi proses hidrasi dan pengaturan ukuran. Pemilihan masing-masing metode yang digunakan ataupun kombinasi dari kedua proses tersebut menjadi perbedaan metode untuk pembuatan liposom (Barenholz, dan Crommelin, 1994).

2.1.3.1 Proses hidrasi

a. Hidrasi lapis tipis

Hidrasi lapis tipis dilakukan dengan proses pengocokan mekanis yang menghasilkan produk MLV (*Multilamellar vesicle*) berukuran sekitar 10 μm . Lipid dilarutkan dalam pelarut organik yang sesuai seperti metanol atau kloroform kemudian pelarut organik dihilangkan dengan *vacuum rotary evaporator* untuk membentuk lapisan lipid tipis pada dinding labu. Larutan buffer kemudian ditambahkan untuk menghidrasi lapisan lipid tipis dan selanjutnya terbentuk liposom dengan bantuan pengadukan atau agitasi dari campuran tersebut.

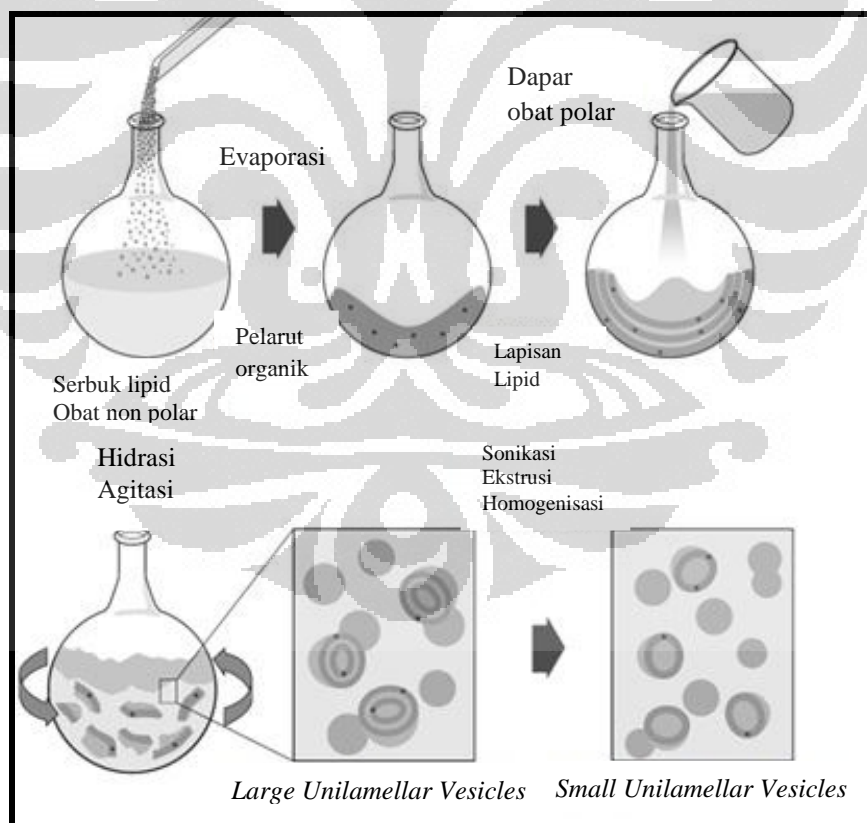
Penggunaan pelarut air dan pelarut organik dengan perbandingan 2:1 dilakukan berdasarkan rasio yang optimal untuk memproduksi liposom dengan ukuran rata-rata yang kecil dan distribusi ukuran yang sempit (Laouini, Jaafar-Maalej, Sfar, Charcosset, dan Fessi, 2011).

b. Pemindahan pelarut organik

Ada dua macam pelarut yang digunakan, yaitu pelarut organik yang dapat bercampur dengan air seperti etanol dan metanol; dan yang tidak dapat bercampur dengan air seperti eter dan kloroform. Produk yang dihasilkan adalah MLV, OLV (*Oligolamellar vesicle*), dan UV (*Unilamellar vesicle*). Beberapa teknik pembentukan liposom dengan pemindahan pelarut organik yaitu evaporasi fase balik (*Reverse-phase Evaporation / REV*) dan metode injeksi eter.

Pada metode evaporasi fase balik, dibuat emulsi air dalam minyak dengan melarutkan fosfolipid pada pelarut organik. Pelarut organik kemudian dihilangkan perlahan dengan tekanan yang dikurangi menggunakan *rotary evaporator* (Venuganti dan Perumal, 2009).

c. Pembentukan campuran lipid-deterjen diikuti proses pemindahan deterjen, menghasilkan produk OLV, UV dan SUV (*Small unilamellar vesicle*).



[Sumber: Lasic, 1997]

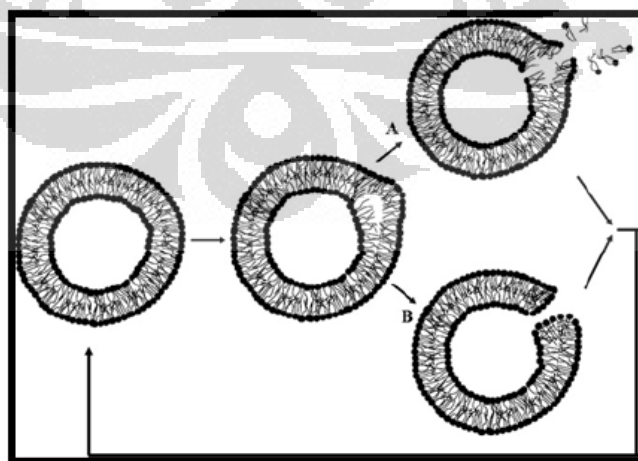
Gambar 2.1 Pembuatan lipid dengan metode hidrasi (telah diolah kembali)

2.1.3.2 Pengaturan Ukuran

a. Ultrasonikasi

Ultrasonik menghasilkan *small unilamellar liposom* dengan ukuran minimal 20 nm. Mekanisme pecahnya liposom oleh ultrasonikasi adalah terbentuknya gas-gas kecil sementara di dalam bagian hidrofobik dari *lipidbilayer*. Adanya gas-gas tersebut dapat memecah fragmen membran dari liposom dan membentuk agregat yang lebih kecil (Schroeder, Kost, & Barenholz, 2009).

Awal tahun 1960-an, ditemukan bahwa dispersi *aqueous* lesitin yang diultrasonikasi menghasilkan bentuk yang disebut misel lesitin. Kemudian beberapa tahun setelahnya, ditemukan bahwa suspensi fosfatidilkolin, sebagai bahan pembentuk fosfolipid pada liposom, diultrasonikasi dengan frekuensi 80kHz dan menghasilkan *small unilamellar vesicles* (SUV). Dengan frekuensi 10-80 kHz dan lama waktu iradiasi satu jam maka akan menghasilkan *small unilamellar vesicles* (SUV) sebesar 25-50 nm. Pemaparan pada fosfolipid yang berbeda dengan *low frequency ultrasound* (LFUS) yang hampir sama akan menghasilkan liposom dengan ukuran yang berbeda-beda (Woodbury, Richardson, Grigg, Welling, Knudson, 2006). Secara teori, semakin lama waktu iradiasi dan atau semakin tinggi daya ultrasonikasi maka akan menghasilkan ukuran liposom yang lebih kecil lagi dan lebih homogen (Schroeder, A., Kost, J., & Barenholz, Y., 2009)



[Sumber: Schroeder, Kost, & Barenholz, 2009]

Gambar 2.2 Mekanisme pecahnya liposom oleh ultrasonikasi (telah diolah kembali)

Universitas Indonesia

b. Ekstruksi

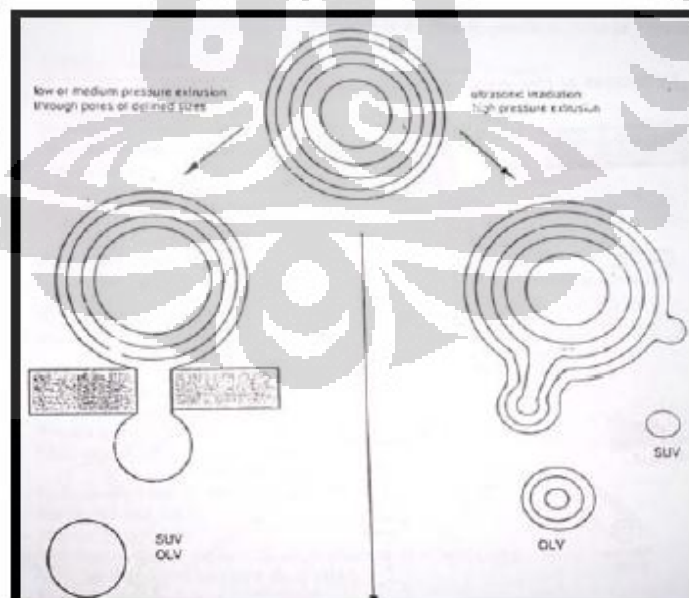
Metode ekstruksi dapat terbagi menjadi ekstruksi bertekanan tinggi dan ekstruksi bertekanan rendah. Ekstruksi bertekanan tinggi menggunakan tekanan di atas 35 MPa, menghasilkan vesikel yang berukuran kecil dan sebagian besar *unilamellar*. Sedangkan, pada ekstruksi bertekanan rendah, tekanan yang digunakan hingga 14 MPa dan ukuran dan distribusi ukuran yang dihasilkan bergantung pada pori membran yang digunakan. Jenis-jenis membran yang dapat digunakan adalah polikarbonat, keramik, dan *stainless steel*.

2.1.4 Mekanisme Pembentukan Liposom

Menurut Barenholz dan Crommelin (1994), pembentukan liposom dapat dijelaskan dengan dua teori yaitu teori pertunasan (*budding off*) dan teori fragmen fosfolipid lapis ganda.

2.1.4.1 Teori Pertunasan (*budding off*)

Teori ini menjelaskan bahwa liposom terbentuk dari hidrasi komponen fosfolipidnya dalam susunan lapisan yang teratur menyebabkan terbentuknya tunas dari lipid lapis ganda dan mengarah pada pembentukan ukuran yang tetap.



[Sumber: Barenholz & Crommelin, 1994]

Gambar 2.3 Pembentukan liposom berdasarkan teori *budding off* (telah diolah kembali)

2.1.4.2 Teori Fragmen Fosfolipid Lapis Ganda (*Bilayer Phospholipid Fragment / BPF*)

Pembentukan hidrasi fosfolipid lapis ganda disebabkan adanya ketidakstabilan termodinamik saat molekul hidrofobik terpapar fase air melebur dengan fragmen lain untuk membentuk vesikel lipid. Ketidakstabilan termodinamik pada tepi fragmen fosfolipid lapis ganda menyebabkan lengkungan dan saat fragmen lipid lapis ganda berdekatan akan terbentuk vesikel.

2.1.5 Stabilitas Liposom

Liposom dapat berubah kestabilannya selama kondisi penyimpanan, dimana kestabilannya dipengaruhi baik secara kimia maupun fisika. Perubahan kestabilan secara kimia dan fisik dapat mempengaruhi disposisi obat yang terjerap dan keamanan liposom.

2.1.5.1 Stabilitas Kimia

Stabilitas liposom secara kimiawi dipengaruhi oleh reaksi peroksidasi dari fosfolipid dan sterol dan reaksi hidrolisis dari fosfolipid. Reaksi hidrolisis dipengaruhi oleh suhu, rigiditas, dan pH. Degradasi dari fosfolipid karena hidrolisis dapat mempengaruhi fungsi lapis ganda dari liposom, seperti permeabilitasnya. Contohnya pada fosfatidilkolin, reaksi hidrolisis menyebabkan degradasi ikatan esternya. Reaksi peroksidasi terjadi pada ikatan tidak jenuh rantai asil fosfolipid yang diinduksi oleh autooksidasi melalui mekanisme radikal bebas atau fotooksidasi. Pencegahan terjadinya reaksi peroksidasi dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu:

- a. Menggunakan lipid yang hanya memiliki ikatan jenuh.
- b. Lipid disimpan pada kondisi vakum atau dengan gas inert.
- c. Disimpan di tempat gelap untuk menghindari oksidasi oleh cahaya.
- d. Menggunakan bahan-bahan kimia yang kualitasnya bagus.
- e. Menghindari logam berat.
- f. Menambahkan agen pengkelat.
- g. Menambahkan antioksidan seperti α -tokoferol, hidroksitoluen, hidroksianisol, dan lainnya.

- h. Menggunakan metode *freeze dry* (juga dapat digunakan untuk pencegahan reaksi hidrolisis).

2.1.5.2. Stabilitas Fisik

Liposom dapat membentuk agregat pada kondisi tertentu, terutama adanya hidrasi, yang kemudian agregat-agregat tersebut dapat bergabung. Pembentukan agregat dapat dipengaruhi oleh lipid penyusun lapis ganda, ukuran partikel, kekuatan ion dari medium inkubasi, obat yang dienkapsulasi, dan suhu.

Pencegahan agregasi umumnya dapat dilakukan dengan penambahan molekul bermuatan seperti fosfatidilgliserol pada kondisi pH asam, atau kolesterol hemisuksinat pada kondisi pH netral dan dengan penambahan molekul hidrofilik yang besar seperti PEG (polietilen glikol).

2.1.6 Evaluasi

Setelah proses tahapan pembuatan liposom selesai, dilakukan evaluasi terhadap liposom tersebut yang meliputi:

2.1.6.1 Morfologi (Bentuk Fisik)

Evaluasi morfologi meliputi evaluasi fisik terhadap liposom yang terbentuk, evaluasi yang dilakukan antara lain evaluasi terhadap ukuran dan tebal liposom yang terbentuk. Alat yang digunakan adalah mikroskop elektron yaitu *Scanning Electron Microscopy* (SEM) ataupun *Transmission Electron Microscopy* (TEM). Untuk dapat mengukur ukuran liposom yang mikroskopik diperlukan suatu instrumen berupa SEM, sedangkan untuk mengukur ketebalan yang terbentuk, diperlukan suatu instrumen yang dapat menganalisa liposom secara tiga dimensi oleh karena itu diperlukan alat berupa TEM.

a. SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

Terkadang liposom memiliki ukuran yang cukup besar untuk dilihat dengan menggunakan mikroskop biasa (diameter 1-10 μm). Namun karena keterbatasan ukuran yang dapat dilihat oleh mikroskop optik biasa maka mikroskop elektron memiliki peran yang penting dalam menampilkan ukuran dan bentuk nanopartikel yang tidak dapat terlihat dengan mikroskop optik biasa. Tidak semua liposom dapat dilihat dengan menggunakan SEM secara langsung, liposom

mungkin tidak cukup memiliki agen pengkontras sehingga penambahan agen pengkontras dari luar perlu dilakukan. Agen pengkontras yang biasa ditambahkan biasanya emas (Barenholz & Crommelin, 1994).

b. TEM (*Transmission Electron Microscopy*)

Mirip dengan SEM, TEM (*Transmission Electron Microscopy*) merupakan suatu metode untuk mengevaluasi ukuran dan morfologi nanopartikel. Tomografi TEM memiliki resolusi yang lebih besar daripada SEM dan gambar yang dihasilkan dapat diperbesar lebih banyak daripada gambar yang dihasilkan oleh SEM (Barenholz & Crommelin, 1994).

2.1.6.2 Distribusi Ukuran Partikel

Distribusi ukuran partikel diukur dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* berupa *Laser Light Scattering* atau *Coulter Counter*. Mekanisme dalam metode *Laser Light Scattering* adalah difraksi cahaya, difusi cahaya, atau keduanya. Metode ini lebih sederhana dan sangat efisien. Rentang ukuran partikel yang diukur cukup luas yaitu antara 10 nm – 1 mm. Sedangkan, pada metode *Coulter Counter*, mekanisme yang terjadi adalah adanya tahanan elektrik saat dispersi partikel melewati dua elektroda. Ketika kepadatan partikel dispersi cukup, setiap pulsa tegangan akan berinteraksi dengan setiap partikel sehingga distribusi ukuran partikel dapat diperkirakan (Williams & Vaughn, 2007).

2.1.6.3 Efisiensi Penjerapan Spiramisin oleh Liposom

Efisiensi penjerapan spiramisin dilakukan dengan metode sentrifugasi. Supernatan diambil dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 231,5 nm. Serapan yang terukur menyatakan spiramisin bebas yang tidak terjerap oleh liposom sedangkan spiramisin yang terjerap adalah spiramisin total dikurangi dengan spiramisin bebas. Untuk menghitung persen spiramisin yang terjerap digunakan rumus seperti berikut :

$$C_{\text{bebas}} = \frac{(y - a) \times FP}{b \times 1000} \quad (2.1)$$

Keterangan:

C bebas = jumlah obat yang bebas (mg)

y = serapan sampel

FP = faktor pengenceran

a dan b didapat dari persamaan kurva kalibrasi

1000 = faktor konversi dari μg ke mg

$$\% \text{ Efisiensi penyerapan} = \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{bebas}}}{C_{\text{total}}} \times 100\% \quad (2.2)$$

Daya jera spiramisin oleh liposom diukur dengan membandingkan konsentrasi spiramisin yang terjerap dengan konsentrasi spiramisin total. Konsentrasi spiramisin yang terjerap diperoleh dari hasil pengurangan konsentrasi spiramisin total dengan konsentrasi spiramisin yang bebas kemudian dibagi konsentrasi spiramisin total dan dikali dengan 100%.

2.1.6.4 Pelepasan Obat pada Berbagai Kondisi pH

Uji sensitivitas liposom dilakukan dengan melakukan pengukuran pelepasan obat pada tiga kondisi pH yaitu pH 2; pH 5,5; dan pH 8. Presipitat (liposom yang terjerap) dari hasil pemurnian kemudian dicampur dengan masing-masing 2,0 ml lautan dapar pH 2; pH 5,5; dan pH 8. Cara uji yang digunakan adalah modifikasi dari uji sensitivitas pH yang dilakukan oleh Rane & Prabhakar (2009), dimana sampel liposom diinkubasi terlebih dahulu selama 1 jam dengan suhu 37°C kemudian dilakukan dialisis selama delapan jam pada kondisi suhu tersebut.

Masing-masing campuran larutan didialisis menggunakan medium 100 ml masing-masing larutan dapar pH 2; pH 5,5; dan pH 8. Larutan pada medium dipipet sebanyak 10,0 setiap jam dan setiap 15 menit pada satu jam pertama, lalu dimasukkan ke dalam vial. Sampel pada vial kemudian diukur serapannya dan hasil pengukuran dimasukkan ke dalam rumus berikut :

$$W_t = \frac{(y_t - a) \times m \times FP}{b \times 1000} \quad (2.3)$$

Keterangan:

W_t = jumlah obat yang terdialisis dari sampel waktu pertama (mg)

y_t = serapan sampel

m = volume medium reseptor (ml)

FP = faktor pengenceran

a dan b didapat dari persamaan kurva kalibrasi

1000 = faktor konversi dari μg ke mg

$$W_n = \frac{(y_n - a) \times s}{b \times 1000} + \dots + W_t \quad (2.4)$$

Keterangan:

W_n = berat akumulatif sampel jam berikutnya (mg)

y_n = serapan sampel

s = volume sampel (ml)

a dan b didapat dari persamaan kurva kalibrasi

1000 = faktor konversi dari μg ke mg

Setelah itu, persentase terdialisis spiramisin dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ terdialisis} = \frac{W_n}{C_{t2}} \times 100 \% \quad (2.5)$$

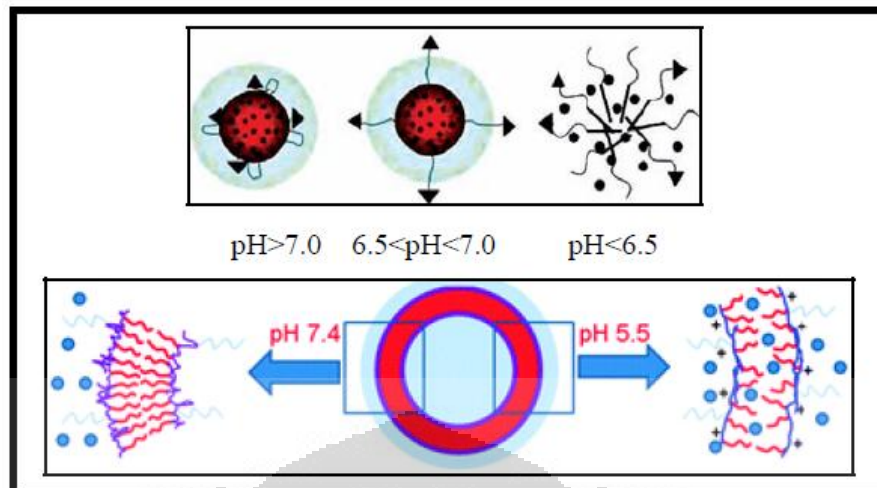
Keterangan:

W_n = berat akumulatif sampel (mg)

C_{t2} = konsentrasi spiramisin yang terjerap dalam x ml suspensi liposom (mg)

2.1.7 Liposom Sensitif pH

Liposom sensitif pH adalah liposom yang komponen lipidnya akan mengalami destabilisasi jika ada perubahan pH. Mekanisme pelepasan obat dari liposom sensitif pH yaitu liposom akan mengalami endositosis, terinternalisasi di endosom, dimana pH lingkungan menurun dari 7,4 menjadi 5,0, kemudian liposom akan melebur dengan membran endosom. Struktur lipid dari bahan penyusun liposom akan mengalami transisi dari fase lamela menjadi fase heksagonal. Liposom akan melepaskan bahan terapeutiknya di lisosom.

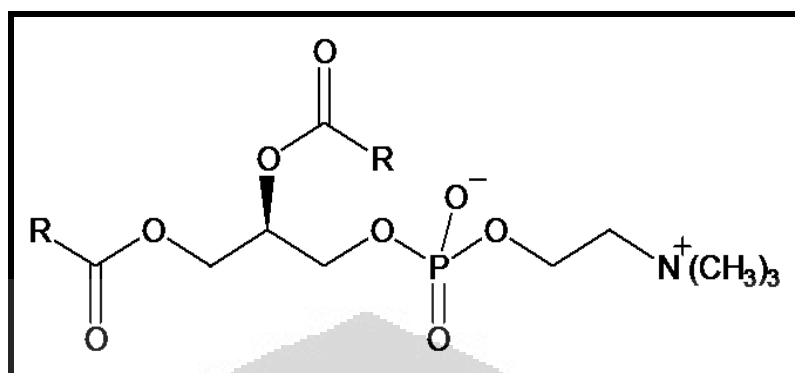


[Sumber: Shen, Huadong, Radosz, Kirk, Murdoch, 2008]

Gambar 2.4 Mekanisme destabilisasi liposom sensitif pH (telah diolah kembali)

Komposisi bahan penyusun liposom dapat mempengaruhi kemampuan interaksinya dengan sel. Komponen lipid penyusun liposom dapat dikelompokkan menjadi lima komponen yaitu fosfolipid, asam amino terasilasi, asam lemak, kolesterol dan derivatnya, dan molekul ampifilik rantai ganda lainnya. Penggunaan fosfolipid jenis fosfatidiletanolamin dapat meningkatkan pelepasan liposom dengan membran endosom dan meningkatkan transfeksi. Penggunaan asam oleat (OA) diteliti secara *in vivo* dapat meningkatkan stabilitas liposom pada pH serum yaitu pH 7,4 dimana lipid berada dalam fase lamelar (Ropert, 1999). Berdasarkan penelitian, penggunaan liposom sensitif pH digunakan untuk meningkatkan penghantaran protein, senyawa sitotoksik, RNA dan DNA ke sitoplasma.

2.2 Fosfatidilkolin



[Sumber: O'Neil *et al.*, 2001]

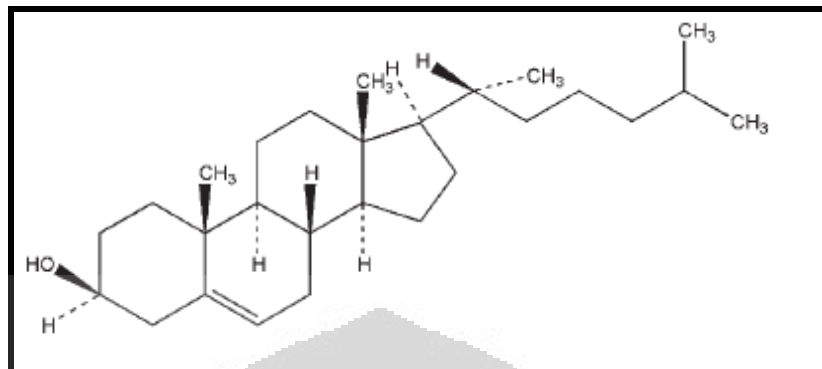
Keterangan: R adalah asam lemak

Gambar 2.5 Struktur kimia dari fosfatidilkolin (telah diolah kembali)

Fosfatidilkolin berupa serbuk putih dengan bobot molekul 600-5000 dan mudah larut dalam pelarut organik. Fosfatidilkolin yang memiliki nama trivial lesitin adalah fosfolipid yang paling banyak terdapat di hewan dan tumbuhan. Fosfatidilkolin merupakan molekul utama penyusun membran lipid *bilayer* sehingga fosfatidilkolin dapat digunakan sebagai bahan penyusun liposom dan dapat bersifat *biodegradable* (Rowe, Sheskey dan Quinn, 2009). Selain itu, ada pula fosfatidilkolin yang berwarna kuning dengan bau yang khas seperti pada *egg yolk phosphatidilcholine*. Fosfatidilkolin juga merupakan komponen integral dari lipoprotein dan fosfolipid utama yang bersirkulasi di plasma, dapat bersifat netral sampai *zwitterionic*, memiliki rentang pH yang luas dari asam kuat sampai basa kuat. Fosfatidilkolin juga berguna untuk menstabilkan suspensi dan emulsi secara fisik.

Dalam penyimpanannya, fosfolipid harus terhindar dari panas dan cahaya. Liposom fosfolipid mudah terdegradasi karena oksidasi dan hidrolisis. Untuk meminimalisasi oksidasi, proses pembuatannya harus terhindar dari oksigen serta dapat digunakan antioksidan.

2.3 Kolesterol

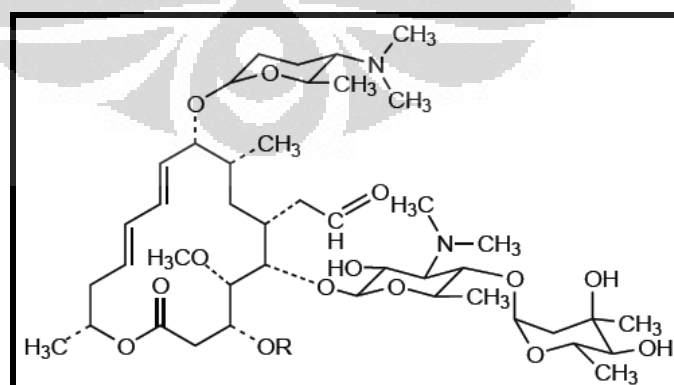


[Sumber: O'Neil *et al.*, 2001]

Gambar 2.6 Struktur kimia kolesterol (telah diolah kembali)

Kolesterol adalah steroid alkohol yang tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik seperti kloroform (1 : 4,5), etanol (1 : 78) dan metanol (1 : 153). Pada organisme hidup, senyawa ini terdapat dalam membran sel, lipoprotein plasma, dan empedu. Senyawa ini dapat berasosiasi dengan lipid lain seperti fosfolipid dan asam empedu. Kolesterol yang berbentuk serbuk atau granul, berwarna putih atau kuning pudar serta tidak berbau. Dalam formulasi farmasetik, kolesterol biasa digunakan sebagai agen pengemulsi. Namun, dalam pembuatan liposom, kolesterol digunakan sebagai penstabil liposom pada pH serum yaitu 7,4 (Karki, Subramanya, dan Udupa, 2009).

2.4 Spiramisin



[Sumber: O'Neil *et al.*, 2001]

Gambar 2.7 Struktur kimia spiramisin (telah diolah kembali)

Spiramisin memiliki bobot molekul sebesar 843,06 g/mol. Spiramisin berupa serbuk berwarna putih atau sedikit kuning. Spiramisin larut dalam air dalam perbandingan 1:50, sangat larut dalam etanol, metanol, aseton, dan kloroform. Obat ini efektif terhadap kuman stafilokokus, streptokokus, pneumonokokus enterokokus, *Neisseria*, *Boretella pertusis*, *Rickettsia*, ameba dan sangat efektif terhadap *Toxoplasma gondii*. Golongan makrolid menghambat sintesis protein kuman dengan jalan berikatan secara reversibel dengan ribosom subunit 50S, dan umumnya bersifat bakteriostatik, walaupun terkadang dapat bersifat bakteriosidal untuk kuman yang sangat peka (Setiabudy, 2007).

Pada uji coba yang dilakukan terhadap manusia, spiramisin diabsorpsi baik pada penggunaan oral dengan pemberian 15-30 mg/kg berat badan dengan konsentrasi plasma 0,96-1,65 ml/L. Hanya 7-20% dari dosis pemberian oral yang diekskresi melalui urin.

Setelah pemberian intravena, dengan dosis 7,25 mg/kg berat badan, didapatkan volume distribusi yang besar pada sejumlah jaringan, paru-paru dan kulit.

2.5 Asam Palmitat ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$) [Sumber: O'Neil *et al.*, 2001]

Asam palmitat yang mempunyai sinonim *hexadecanoic acid* berupa kristal putih dengan sedikit bau dan rasa yang khas. Senyawa ini larut dalam etanol (95%) dan praktis tidak larut dalam air. Dalam formulasi farmasetik, asam palmitat biasa digunakan sebagai emulsifier, digunakan dalam formulasi sediaan oral dan topikal. Asam palmitat juga digunakan dalam pembuatan implan untuk sediaan lepas tertunda dari insulin pada tikus. Asam palmitat dapat digunakan sebagai agen penginduksi peleburan liposom pada pH yang lebih rendah (Cui, Bastiat, Jin, Keyvanloo, Lafleur, 2010)

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasetika Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok serta Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Kesehatan dan Ilmu Kedokteran Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta. Waktu pelaksanaan yaitu dari bulan Februari 2012 sampai dengan Mei 2012.

3.2 Bahan

Egg fosfatidilkolin (Sigma Aldrich, Singapura), kolesterol (Sigma Aldrich, Singapura), spiramisin (Topfond Pharmaceutical Co, China), asam palmitat (Merck, Jerman), kloroform (Merck, Jerman), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Merck, Jerman), kalium klorida (Merck, Jerman), asam klorida (Merck, Jerman), *aquadest* (yang diolah menjadi bebas CO₂), gas nitrogen teknis.

3.2.1 Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 7,4 (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979)

Larutan dapar fosfat dibuat dengan mencampurkan 50 ml kalium dihidrogen fosfat 0,2 M dengan 42,80 ml natrium hidroksida 0,2 N di dalam labu ukur 200,0 ml, kemudian dicukupkan volumenya sedikit demi sedikit dengan *aquadest* hingga 200 ml. Sebelumnya, kalium dihidrogen fosfat 0,2 M dibuat dengan menimbang 1,3609 gram serbuk kalium dihidrogen fosfat, larutkan dengan *aquadest* di dalam labu ukur 250,0 ml, dan dicukupkan volumenya sedikit demi sedikit hingga batas labu ukur. Untuk pembuatan natrium hidroksida 0,2 N pelat natrium hidroksida ditimbang sebanyak 8,0 gram, kemudian dilarutkan dalam 1000 ml *aquadest*.

3.2.2 Pembuatan Larutan Dapar Klorida pH 2 (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979)

Larutan dapar klorida pH 2 dibuat dengan mencampurkan 50 ml kalium klorida 0,2 M dengan 13,0 ml asam klorida 0,2 N, di dalam labu ukur 200,0 ml,

kemudian dicukupkan volumenya sedikit demi sedikit dengan *aquadest* hingga 200 ml.

3.2.3 Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 5,5

Larutan dapar fosfat pH 5,5 dibuat dengan mencampurkan 50 ml kalium dihidrogen fosfat 0,2 M dengan 15 ml natrium hidroksida 0,2 N di dalam labu ukur 200,0 ml, kemudian dicukupkan volumenya sedikit demi sedikit dengan *aquadest* hingga 200 ml.

3.2.4 Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 8 (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979)

Larutan dapar fosfat pH 8 dibuat dengan mencampurkan 50 ml kalium dihidrogen fosfat 0,2 M dengan 46,1 ml natrium hidroksida 0,2 N di dalam labu ukur 200,0 ml, kemudian dicukupkan volumenya sedikit demi sedikit dengan *aquadest* hingga 200 ml.

3.3 Alat

Rotary evaporator (Hahn Shin), *vortex mixer* (Health H-VM-300), membran nylon Milipore 0,2 μm (Whatman), ultrasonikator (Branson 3200), timbangan analitik (Sartorius), pH meter (Eutech), pengaduk magnetik (IKA C-MAG HS7), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV-1601), *Scanning Electron Microscope* (Inspect F50), *Particle Size Analyzer* (Malvern Zetasizer), kamera digital (Panasonic DMC-FH2), *glass beads*, *carbon tape conductivity*, termometer, labu bulat dan alat-alat gelas lainnya.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Liposom Sensitif pH

Liposom sensitif pH dibuat dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis. Lesitin, kolesterol, asam palmitat, dan spiramisin ditimbang sesuai dengan yang tertera dalam formula dan dilarutkan dalam 25 ml kloroform. Larutan dalam kloroform tersebut kemudian dievaporasi menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu $\pm 62^\circ\text{C}$, kecepatan 150 rpm, dan kondisi vakum untuk menguapkan kloroformnya hingga terbentuk lapisan tipis. Proses ini berlangsung sekitar 1 jam. Lapisan tipis yang telah terbentuk tersebut kemudian dialiri gas nitrogen dan

didiamkan selama 24 jam dalam lemari es untuk mencapai kondisi kesetimbangan dengan lingkungan dan menjamin penghilangan pelarut dengan sempurna (Fang, Jia-You, 2005).

Lapisan lipid tipis yang telah disimpan 24 jam tersebut dihidrasi dengan 50 ml larutan dapar pH 7,4 pada suhu 60°C sambil dikelupas dengan *glass beads* hingga terbentuk suspensi berwarna putih kekuningan. Suspensi yang terbentuk kemudian di *vortex* selama 15 menit dan kembali disimpan di dalam vial selama 24 jam di dalam lemari pendingin pada suhu 4°C (Tsai, Li, Yin, Yu, Wen, 2011).

Di bawah ini adalah formulasi pembuatan liposom yang digunakan untuk menghasilkan 50 ml suspensi liposom:

Tabel 3.1. Formula liposom sensitif pH

Bahan	Formula		
	F1	F2	F3
Spiramisin (mg)	204,0	201,0	200,2
Fosfatidilkolin (mg)	801,7	806,1	815,7
Kolesterol (mg)	401,6	402,0	402,5
Asam palmitat (mg)	-	65,2	131,0

3.4.2 Pengecilan Ukuran Partikel

Pengecilan ukuran partikel liposom dilakukan dengan menggunakan metode ultrasonikasi. Suspensi liposom yang telah disimpan selama 24 jam kemudian dimasukkan ke dalam alat ultrasonikator untuk memperkecil dan mensekarkan ukuran partikel liposom. Dilakukan tiga macam perlakuan lamanya waktu sonikasi terhadap ketiga formula liposom tersebut, yaitu tanpa ultrasonikasi, ultrasonikasi selama 40 menit dan 60 menit. Selanjutnya, dilihat perbedaan hasil yang diperoleh dari ketiga perlakuan tersebut.

3.4.3 Pemurnian liposom

Untuk pemisahan obat yang terjerap di dalam vesikel dengan yang tidak terjerap, dilakukan pemurnian liposom dengan metode ultrasentrifugasi yang merupakan modifikasi dari metode yang dilakukan oleh Laoini, Jaafar-Maalej,

Sfar, Charcosset, Fessi (2011) yaitu digunakan 50.000 rpm selama 30 menit dengan suhu 4°C. Melalui proses ultrasentrifugasi ini akan terbentuk pemisahan antara supernatan dan presipitatnya. Liposom yang telah dimurnikan disimpan dalam vial dalam lemari pendingin.

3.4.5 Pembuatan Spektrum Serapan dan Kurva Kalibrasi Spiramisin dalam Larutan Dapar Klorida pH 2; Dapar Fosfat pH 5,5; pH 7,4; dan pH 8.

Spiramisin ditimbang sebanyak 100,0 mg, kemudian dilarutkan ke dalam larutan dapar dalam labu ukur 100,0 ml. Setelah itu, volume larutan dicukupkan dengan pelarut tersebut sedikit demi sedikit hingga tanda batas labu ukur. Larutan spiramisin dengan konsentrasi 1000 ppm dipipet sebanyak 10,0 ml, dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml, dan dicukupkan volumenya dengan larutan dapar. Dari larutan spiramisin 100 ppm. Kemudian diambil lagi 10,0 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, cukupkan volumenya hingga batas. Dari larutan 10 ppm tersebut dibuat tersebut dibuat 7 titik pengenceran untuk pembuatan kurva kalibrasi.

Setiap titik pengenceran diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-VIS dan ditentukan panjang gelombang yang menghasilkan serapan maksimum. Setelah itu larutan dengan konsentrasi 0,3; 1; 2; 3; 4; 5; dan 7 ppm yang dibuat dari larutan spiramisin 10 ppm diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya. Hasil pengukuran tersebut dibuat kurva kalibrasi yang menghubungkan antara konsentrasi larutan dan serapan sehingga didapatkan persamaan kurva kalibrasinya.

3.4.7 Evaluasi Liposom Sensitif pH

3.4.7.1 Morfologi

Morfologi liposom dievaluasi dengan melihat bentuk fisik globul liposom menggunakan mikroskop konvokal dan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dengan perbesaran digital 4000x dan 6000x. Untuk penggunaan SEM, sampel dikeringkan terlebih dahulu dengan diteteskan pada *carbon tape conductivity* berukuran 3 mm x 10 cm, kemudian disimpan dalam desikator selama satu minggu. Preparasi ini perlu dilakukan karena *Scanning Electron Microscopy* (SEM) tidak dapat menganalisis sampel yang mengandung air.

3.4.7.2 Distribusi Ukuran Partikel Liposom

Pengukuran distribusi ukuran partikel dilakukan baik untuk liposom sebelum diultrasonikasi maupun setelah diultrasonikasi. Distribusi ukuran partikel ditetapkan dengan *Particel Size Analyzer* (PSA). Larutan *aquadest* dimasukkan ke dalam *fluid tank* sebagai *baseline*, kemudian sampel dimasukkan ke dalam *fluid tank* tetes demi tetes hingga konsentrasi yang mencukupi, setelah itu akan terukur ukuran partikel globul-globul liposom.

3.4.7.3 Efisiensi Penjerapan Spiramisin oleh Liposom

Efisiensi penjerapan spiramisin dilakukan dengan metode sentrifugasi. Suspensi liposom diultrasentrifugasi dengan kecepatan 14000, 20000 dan 50000 rpm selama 30 menit lalu supernatannya diambil dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 231,5 nm. Serapan yang terukur menyatakan spiramisin bebas yang tidak terjerap oleh liposom sedangkan spiramisin yang terjerap adalah spiramisin total dikurangi dengan spiramisin bebas. Untuk menghitung persen spiramisin yang terjerap digunakan rumus seperti berikut :

$$C_{\text{bebas}} = \frac{(y - a) \times FP}{b \times 1000} \quad (3.1)$$

Keterangan:

C_{bebas} = jumlah obat yang bebas (mg)

y = serapan sampel

FP = faktor pengenceran

a dan b didapat dari persamaan kurva kalibrasi

1000 = faktor konversi dari μg ke mg

$$\% \text{ Efisiensi penjerapan} = \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{bebas}}}{C_{\text{total}}} \times 100\% \quad (3.2)$$

Daya jerap spiramisin oleh liposom diukur dengan membandingkan konsentrasi spiramisin yang terjerap dengan konsentrasi spiramisin total. Konsentrasi spiramisin yang terjerap diperoleh dari hasil pengurangan konsentrasi spiramisin total dengan konsentrasi spiramisin yang bebas dalam x ml sampel kemudian dibagi konsentrasi spiramisin total dan dikali dengan 100%.

3.4.6.4 Pelepasan Obat pada Berbagai Kondisi pH

Uji sensitivitas liposom dilakukan dengan melakukan pengukuran pelepasan obat pada tiga kondisi pH yaitu pH 2; pH 5,5; dan pH 8. Volume sampel yang digunakan adalah 0,5 ml liposom hasil pemurnian. Sampel tersebut kemudian dicampur dengan masing-masing 2,0 ml lautan dapar pH 2; pH 5,5; dan pH 8. Cara uji yang digunakan adalah modifikasi dari uji sensitivitas pH yang dilakukan oleh Rane & Prabhakar (2009), dimana sampel liposom diinkubasi terlebih dahulu selama 1 jam dengan suhu 37°C kemudian dilakukan dialisis selama delapan jam pada kondisi suhu tersebut. Untuk dialisis, digunakan membran selofan dan membran nylon Milipore 0,2 µm (Whatman) kemudian dilihat hasil dari optimasi keduanya.

Masing-masing campuran larutan didialisis menggunakan medium 100 ml masing-masing larutan dapar pH 2; pH 5,5; dan pH 8. Larutan pada medium dipipet sebanyak 10,0 ml setiap jam dan setiap 15 menit pada satu jam pertama, lalu dimasukkan ke dalam vial. Sampel pada vial kemudian diukur serapannya dan hasil pengukuran dimasukkan ke dalam rumus berikut :

$$W_t = \frac{(y_t - a) \times m \times FP}{b \times 1000} \quad (3.3)$$

Keterangan:

W_t = jumlah obat yang terdialisis dari sampel waktu pertama (mg)

y_t = serapan sampel

m = volume medium reseptor (ml)

FP = faktor pengenceran

a dan b didapat dari persamaan kurva kalibrasi

1000 = faktor konversi dari µg ke mg

$$W_n = \frac{(y_n - a) \times s}{b \times 1000} + \dots + W_t \quad (3.4)$$

Keterangan:

W_n = berat akumulatif sampel jam berikutnya (mg)

y_n = serapan sampel

s = volume sampel (ml)

a dan b didapat dari persamaan kurva kalibrasi

1000 = faktor konversi dari µg ke mg

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Liposom Sensitif pH

Pembuatan liposom sensitif pH dilakukan dengan metode hidrasi lapis tipis yang merupakan metode umum yang dipakai untuk pembuatan liposom. Prinsip dari metode hidrasi lapis tipis ini adalah proses pengocokan mekanis. Lipid dilarutkan dalam pelarut organik kemudian pelarut organik diuapkan dengan alat *rotary evaporator* membentuk lapisan lipid tipis (Martin, 1990). Melalui proses hidrasi pada suhu transisi lipid maka akan terbentuk fosfolipid *bilayer* disebabkan adanya ketidakstabilan termodinamik saat molekul hidrofobik terpapar fase air melebur dengan fragmen lain untuk membentuk vesikel lipid. Ketidakstabilan termodinamik pada tepi fragmen fosfolipid *bilayer* menyebabkan lengkungan dan saat fragmen lipid lapis ganda berdekatan akan terbentuk vesikel (Barenholz dan Crommelin, 1994). Bahan penyusun liposom yang utama digunakan adalah fosfatidilkolin dan kolesterol. Pada penelitian ini digunakan tiga formula yaitu tanpa penambahan asam palmitat, dengan penambahan satu mol asam palmitat dan yang ketiga yaitu dengan penambahan dua mol asam palmitat. Formula yang dibuat dapat dilihat pada Tabel 3.1. Formula yang digunakan yaitu menurut perbandingan molar dengan perbandingan fosfatidilkolin : kolesterol : asam palmitat berturut-turut yaitu 4:4:0 ; 4:4:1 ; dan 4:4:2. Pada formula dua dan formula tiga ditambahkan sejumlah asam palmitat dengan perbandingan satu mol dan dua mol yang diharapkan liposom yang akan dibuat dapat memberikan sifat sensitif pH. Sejumlah bahan yang tertera pada formulasi dilarutkan pada kloroform sebanyak 25 ml yang selanjutnya dihidrasi dengan 50 ml larutan dapar fosfat pH 7,4 hingga terbentuk suspensi berwarna putih kekuningan. Penggunaan pelarut air dan pelarut organik dengan perbandingan 2:1 dilakukan berdasarkan rasio yang optimal untuk memproduksi liposom dengan ukuran rata-rata yang kecil dan distribusi ukuran yang sempit (Laouini, Jaafar-Maalej, Sfar, Charcosset, dan Fessi, 2011).

Zat aktif yang digunakan pada penelitian ini yaitu spiramisin. Spiramisin memiliki kelarutan yang lebih baik dalam pelarut organik dibandingkan di dalam

air yaitu 1:50. Oleh karena itu, spiramisin dilarutkan bersama komponen lipid di dalam kloroform.

Dari hasil percobaan pendahuluan, didapatkan sejumlah kondisi optimum yang digunakan pada penelitian ini. Diantaranya kecepatan putaran saat pembentukan lapis tipis, kondisi vakum, penggunaan gas N₂, serta lamanya penggunaan alat ultrasonikator untuk mengecilkan ukuran partikel. Pada pembuatan lapis tipis, fosfatidilkolin, kolesterol, asam palmitat dan spiramisin dilarutkan dalam 25 ml kloroform kemudian dievaporasi dengan kecepatan 150 rpm dengan suhu $\pm 62^{\circ}\text{C}$. Digunakan kecepatan 150 rpm agar lapis tipis yang dihasilkan merata, tidak terpusat di bagian bawah labu bulat melainkan terbentuk pada dinding labu secara merata. Suhu yang digunakan yaitu sekitar 62°C karena suhu tersebut di atas titik leleh lipid. Penggunaan pompa vakum juga tidak dinyalakan sejak awal melainkan dihidupkan bertahap agar terbentuk lapisan tipis pada dinding labu yang merata. Selanjutnya lapis tipis yang terbentuk dialiri gas N₂ untuk meyakinkan agar tidak ada lagi kloroform yang tersisa untuk mencegah lipid teroksidasi dan menyempurnakan penguapan kloroform sehingga tidak mengganggu proses hidrasi.

Pada proses hidrasi dengan larutan dapar, pengelupasan lapisan tipis lipid dibantu dengan memasukkan *glass beads* ke dalam labu untuk membantu mengangkat kerak lapisan lipid yang menempel pada dinding tabung sehingga lapisan tipis dapat terdispersi sempurna dan membentuk suspensi liposom yang homogen. Hidrasi dilakukan pada *rotary evaporator* dengan suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ yaitu pada suhu transisinya. Proses ini dilakukan selama satu jam tanpa divakum sehingga lapisan tipis bercampur sempurna dengan fase air. Setelah lapis tipis dihidrasi, suspensi liposom divortex selama 15 menit, kemudian disimpan selama 24 jam di dalam lemari pendingin.

Secara fisik, hasil suspensi liposom yang terbentuk adalah suspensi berwarna putih kekuningan. Tidak ada perbedaan warna yang mencolok antara formula satu, formula dua dan formula tiga.

4.2 Pengecilan Ukuran Partikel

Setelah liposom didiamkan selama 24 jam, dilakukan pengecilan ukuran partikel dan pemurnian liposom. Pengecilan ukuran partikel dilakukan dengan menggunakan alat ultrasonikator sedangkan pemurnian liposom dilakukan dengan ultrasentrifugasi karena metode ini sangat efektif dilakukan dengan waktu yang relatif singkat dibandingkan dengan metode dialisis.

Pada percobaan pendahuluan pengecilan ukuran partikel, dilakukan orientasi terhadap tiga perlakuan yaitu sebelum ultrasonikasi, ultrasonikasi 40 menit dan 60 menit. Hasil pengukuran distribusi ukuran partikel dengan PSA menunjukkan penurunan rata-rata ukuran partikel dengan penambahan waktu 221,4 nm; 165,1 nm; dan 167,9 nm. Oleh karena itu, untuk percobaan selanjutnya waktu yang dipilih untuk pengecilan ukuran partikel adalah 40 menit karena tidak terjadi perubahan ukuran globul yang signifikan jika dibandingkan dengan ultrasonikasi selama 60 menit.

4.3 Pemurnian Liposom

Pemurnian liposom dilakukan dengan metode ultrasentrifugasi untuk memisahkan zat aktif spiramisin yang tidak terjerap di dalam vesikel liposom. Melalui gaya sentrifugalnya, mendorong liposom turun ke bawah terkait dengan ukuran partikelnya menjadi bentuk terflokulasi pada dispersinya. Dilakukan percobaan pendahuluan dengan alat ultrasentrifugasi pada 14.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Namun hasil yang didapatkan adalah tidak adanya pemisahan yang jelas antara supernatan dan presipitat. Oleh karena itu, kecepatan sentrifugasi dinaikkan menjadi 50.000 rpm pada suhu yang sama 4°C dan waktu yang sama selama 30 menit. Pada kondisi inilah, liposom terpisah dengan jelas antara supernatan dan presipitatnya. Hasil supernatan dari ketiga formula liposom yang telah disentrifugasi ini yang dianalisis kadar spiramisin yang tidak terjerapnya menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis sehingga didapat hasil persentase efisiensi penjerapan dari liposom.

4.4 Pembuatan kurva kalibrasi spiramisin

4.4.1 Dalam larutan dapar fosfat pH 7,4

Larutan spiramisin dalam dapar fosfat pH 7,4 dengan konsentrasi 3 µg/ml menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 231,5 nm. Kurva kalibrasi spiramisin dalam dapar fosfat pH 7,4 dengan konsentrasi 0,3; 1; 2; 3; 4; 5; dan 7 µg/ml kemudian dibuat. Persamaan kurva kalibrasi yang didapatkan adalah $y = 0,0303x + 0,0020$ dengan $r = 0,9999$.

4.4.2 Dalam larutan dapar klorida pH 2

Larutan spiramisin dalam dapar klorida pH 2 dengan konsentrasi 3 µg/ml menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 231,5 nm. Kurva kalibrasi spiramisin dalam dapar klorida pH 2 dengan konsentrasi 0,3; 1; 2; 3; 4; 5; dan 7 µg/ml kemudian dibuat. Persamaan kurva kalibrasi yang didapatkan adalah $y = 0,0303x + 0,0085$ dengan $r = 0,9999$.

4.4.3 Dalam larutan dapar fosfat pH 5,5

Larutan spiramisin dalam dapar fosfat pH 5,5 dengan konsentrasi 3 µg/ml menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 231,5 nm. Kemudian dibuat kurva kalibrasi spiramisin dalam dapar fosfat pH 5,5 dengan konsentrasi 0,3; 1; 2; 3; 4; 5; dan 7 µg/ml kemudian dibuat. Persamaan kurva kalibrasi yang didapatkan adalah $y = 0,0311x + 0,0044$ dengan $r = 0,9998$.

4.4.4 Dalam larutan dapar fosfat pH 8

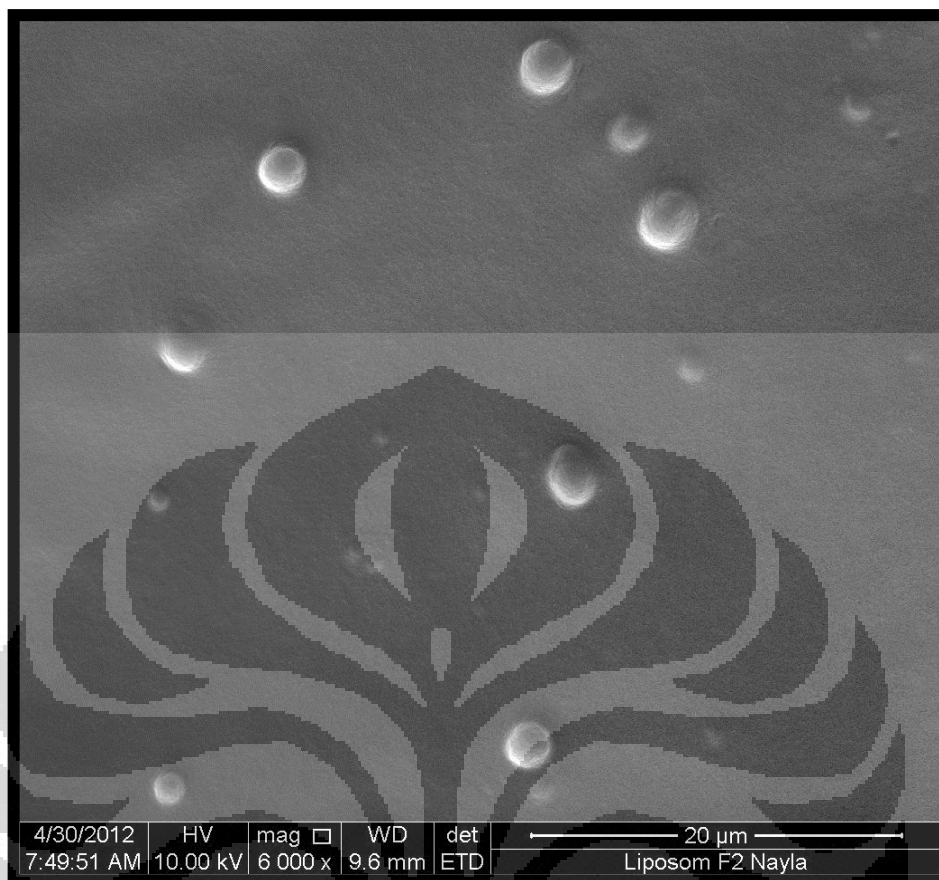
Larutan spiramisin dalam dapar fosfat pH 8 dengan konsentrasi 3 µg/ml menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 231,5 nm. Kemudian, dibuat kurva kalibrasi spiramisin dalam dapar fosfat pH 8 dengan konsentrasi 0,3; 1; 2; 3; 4; 5; dan 7 µg/ml. Persamaan kurva kalibrasi yang didapatkan adalah $y = 0,0307x + 0,0096$ dengan $r = 0,9998$.

4.5 Evaluasi Liposom Sensitif pH

4.5.1 Morfologi

Evaluasi morfologi liposom dilakukan dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan kamera konfokal. Kendala yang dihadapi pada pengukuran menggunakan SEM adalah sampel yang berbentuk suspensi sedangkan kondisi sampel yang diperlukan agar dapat dianalisis menggunakan SEM adalah berbentuk padatan. Oleh karena itu, dilakukan pengeringan suspensi liposom dilakukan dengan cara meneteskan suspensi liposom pada *carbon tape conductivity* dan disimpan di dalam desikator selama satu minggu. Hasil yang diperoleh dari evaluasi sampel menggunakan SEM dengan digital zoom 6000 kali menunjukkan terbentuknya globul-globul liposom di dalam suspensi. Untuk evaluasi dengan menggunakan kamera konfokal tidak didapatkan hasil karena kesensitifitasan mikroskop konfokal untuk mendeteksi molekul di bawah 400 nm sangat kecil sedangkan globul sampel yang dihasilkan diduga berukuran 100-200 nm.

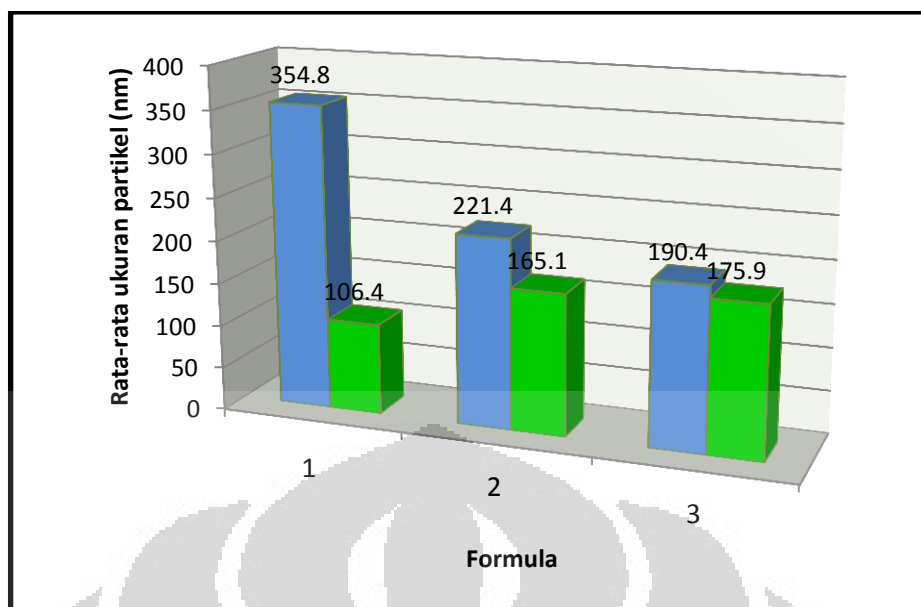
Contoh gambar hasil pengukuran dengan SEM dapat dilihat pada Gambar 4.1. Melalui evaluasi SEM diperlihatkan globul-globul liposom namun tidak dapat memperlihatkan lapisan-lapisan lamellanya, hanya terlihat bentuk-bentuk bulat dari globul. Hasil pengukuran diameter globul liposom dapat dilihat pada Lampiran 10.



Gambar 4.1 Morfologi liposom formula 2 hasil pengukuran dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dengan *digital zoom* 6000x (telah diolah kembali)

4.5.2 Distribusi Ukuran Partikel

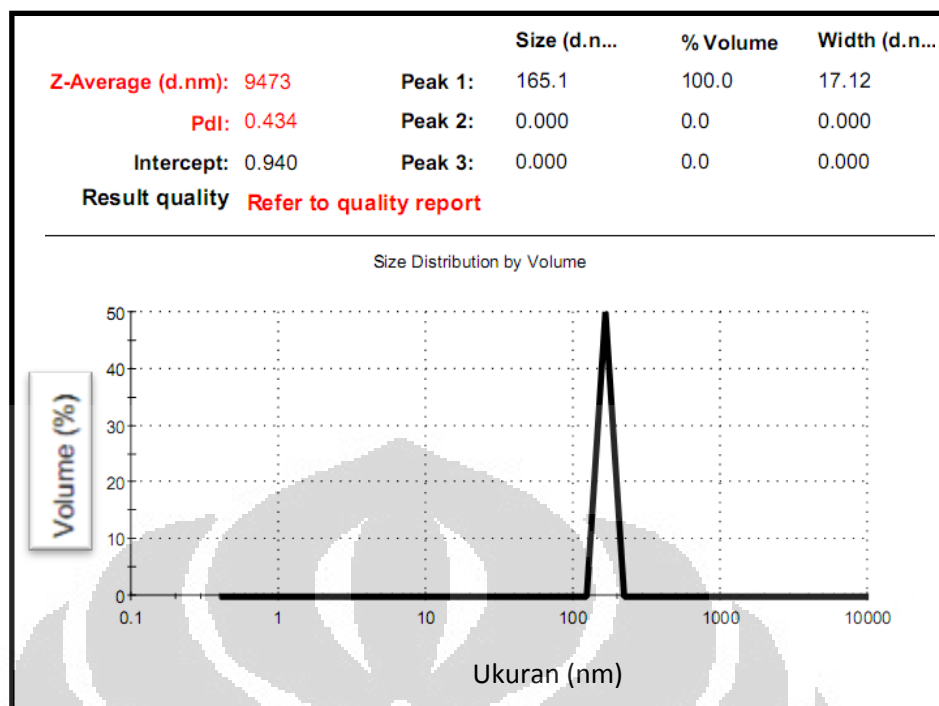
Pengukuran distribusi ukuran partikel dilakukan dengan menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA). Hasil pengukuran distribusi ukuran partikel dapat dilihat pada gambar 4.2. Evaluasi distribusi ukuran partikel dilakukan pada ketiga formula yang sudah diultrasonikasi. Dari hasil optimasi, diperoleh waktu untuk ultrasonikasi yaitu 40 menit.



Keterangan : (■)Perlakuan sebelum ultrasonikasi, (■)Perlakuan setelah ultrasonikasi 40 menit

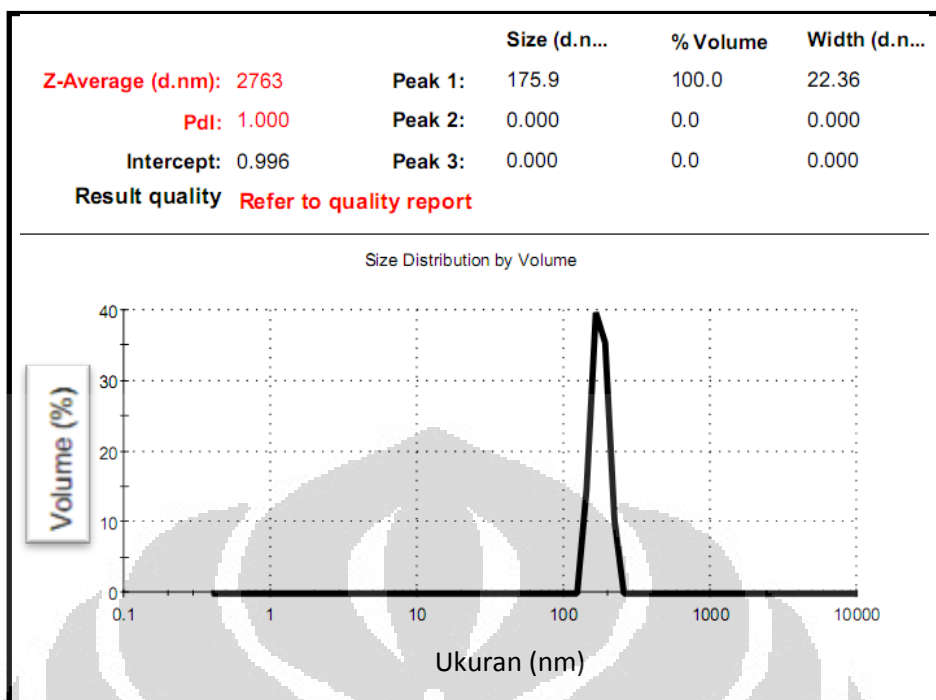
Gambar 4.2 Diagram rata-rata distribusi ukuran partikel liposom hasil pengukuran dengan *Particle Size Analyzer*.

Hasil pengukuran tersebut menunjukkan partikel liposom sebelum disonikasi rata-rata berukuran sekitar 200 - 400 nm. Untuk itu, dilakukan pengecilan ukuran partikel dengan ultrasonikasi. Setelah dilakukan pengecilan ukuran partikel selama 40 menit, partikel berukuran rata-rata sekitar 100-200 nm. Adanya penambahan asam palmitat pada formula 2 dan 3 menyebabkan ukuran globul yang lebih besar daripada formula 1 setelah dilakukan ultrasonikasi selama 40 menit. Hal ini diduga karena terjadinya agregasi selama proses ultrasonikasi dimana pada proses tersebut menimbulkan panas di sekitar lingkungannya diakibatkan adanya perubahan energi kemudian globul liposom terflokulasi membentuk gabungan globul yang lebih besar sehingga terdeteksi pada PSA dengan ukuran yang lebih besar.



Gambar 4.3 Grafik distribusi ukuran partikel liposom formula 2 setelah ultrasonikasi 40 menit hasil pengukuran dengan PSA

Ditinjau dari keseragaman ukuran partikel, didapat data distribusi ukuran partikel terhadap intensitas yang menunjukkan keseragaman yang tinggi pada liposom yang diultrasonikasi selama 40 menit ditunjukkan dengan terdapat 1 *peak* saja yang muncul dan intensitas (persentase volume) sebesar 100%. Dari formula 2, didapat rata-rata ukuran globul sekitar 165 nm sedangkan pada formula 3 didapat rata-rata ukuran globul sekitar 175 nm. Contoh gambar hasil pengukuran dengan PSA dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan 4.4.



Gambar 4.4 Grafik distribusi ukuran partikel liposom formula 3 setelah ultrasonikasi 40 menit hasil pengukuran dengan PSA

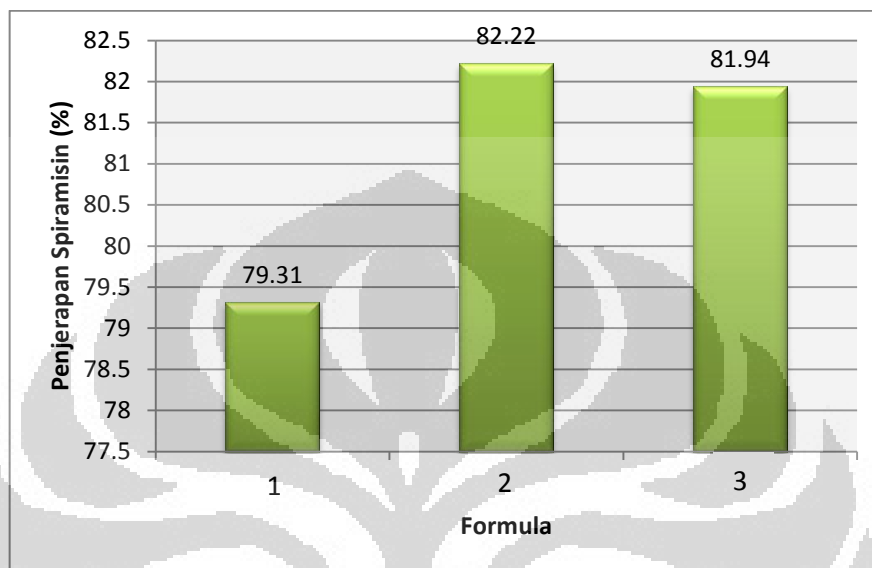
Hasil pengukuran distribusi ukuran partikel sebelum dan sesudah ultrasonikasi selama 40 menit pada formula 1, formula 2 dan formula 3 dapat dilihat pada Lampiran 11-13.

4.5.3 Efisiensi Penjerapan Spiramisin oleh Liposom

Persentase efisiensi penjerapan dihitung dari hasil evaluasi terhadap konsentrasi supernatan yang terbentuk, yaitu besarnya persentase spiramisin yang terjerap liposom yang ada pada presipitat. Liposom yang telah diultrasonikasi dan dimurnikan dengan cara ultrasentrifugasi selama 30 menit, diambil supernatannya sebanyak 2 ml lalu dianalisis kadar spiramisin yang tidak terjerap di dalam liposom pada supernatan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Hasil evaluasi persen penjerapan spiramisin oleh liposom berturut-turut yaitu 79,31%; 82,22%; 81,94%. Pada formula dua terjadi peningkatan dari formula satu yaitu sebanyak 2,91%. Kenaikan ini dikarenakan adanya asam palmitat yang dapat menambah kestabilan liposom sehingga jumlah spiramisin yang terjerap lebih banyak dibandingkan formula 1 tanpa asam palmitat. Diagram

presentase efisiensi penyerapan spiramisin oleh liposom dapat dilihat pada Gambar 4.5. Contoh perhitungan efisiensi penyerapan spiramisin oleh liposom dapat dilihat pada Lampiran 25.



Gambar 4.5 Diagram persentase efisiensi penyerapan spiramisin oleh liposom

Penurunan persentase efisiensi penyerapan spiramisin dalam liposom dari formula dua ke formula tiga diduga karena meningkatnya perbandingan jumlah asam palmitat yang akan meningkatkan stabilitas dengan menurunkan mobilitas molekul dan mengurangi permeabilitasnya. Karena mobilitas dan permeabilitasnya berkurang maka akan meningkatkan rigiditas dinding vesikel pada konsentrasi optimum. Faktor lain juga dapat disebabkan oleh pengaruh kejenuhan dari formula dan pengaruh penghomogenan pada saat proses hidrasi.

4.5.4 Uji Sensitivitas Terhadap Berbagai Kondisi pH

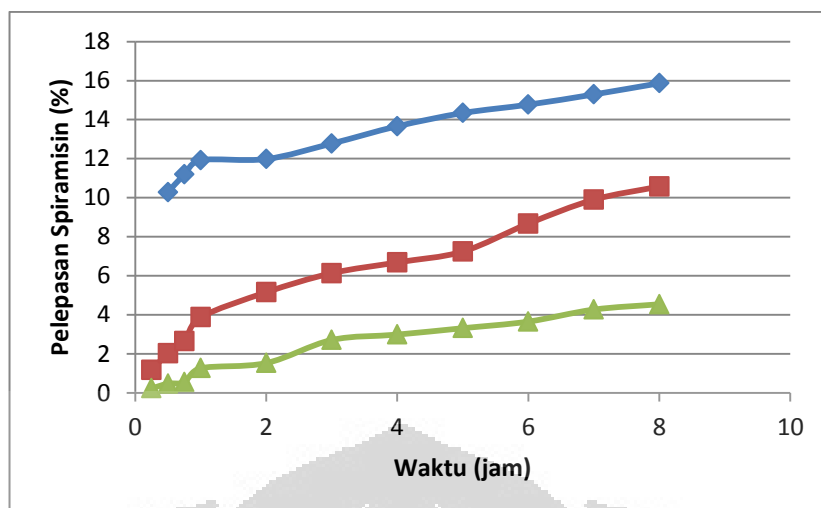
Evaluasi sensitivitas liposom pada pH dilakukan pada tiga kondisi pH yaitu pH 2; pH 5,5; dan pH 8. Dengan adanya penambahan asam palmitat, liposom diharapkan stabil pada kondisi pH 8 (pH basa) dan sensitif pada pH asam yaitu pH 2 dan pH 5,5. Pengujian juga dilakukan dengan cara dialisis.

Sebelumnya dilakukan orientasi membran yang akan digunakan sebagai membran dialisis. Pada awalnya digunakan membran dialisis selofan namun

terjadi kekeruhan pada medium reseptor dikarenakan ukuran pori-pori pada selofan yang lebih besar dari pada ukuran liposom yang terbentuk sehingga liposom turun ke medium reseptor. Lalu digunakan membran nylon Whatman berukuran 0,2 μ m dan medium reseptor pun tidak keruh lagi sehingga membran ini dipakai untuk dialisis.

Presipitat hasil pemurnian diadkan volumenya hingga 1,5 ml kemudian dibagi menjadi 3 bagian untuk uji pada pH 2; pH 5,5; dan pH 8 sehingga masing-masing pH yaitu 500 μ L pada tiap vial. Selanjutnya tiap vial ditambahkan 2 ml dapar masing-masing pH 2; pH 5,5; dan pH 8. Kemudian diinkubasi selama 1 jam dengan suhu 37°C. Dialisis dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* dengan volume medium sebagai reseptor sebanyak 100 ml dan volume sampel yang diambil adalah 10,0 ml, dilakukan pada suhu 37°C yang dianalogikan sebagai suhu tubuh.

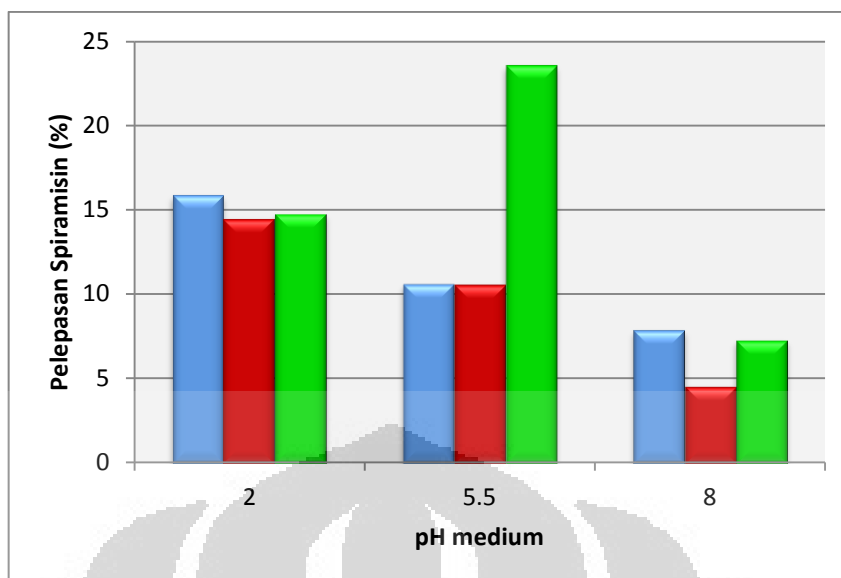
Berdasarkan percobaan pendahuluan, didapatkan waktu evaluasi yang dibutuhkan yaitu selama delapan jam, dimana grafik pengukuran serapan mulai mendatar pada jam ke-6. Hal tersebut menunjukkan tidak ada lagi spiramisin yang lepas dari liposom dan terdialisis. Kesensitivan liposom pada pH terukur dari persentase obat yang dilepaskan oleh liposom. Namun, pada perlakuan dengan skala besar, pada jam ke-8 masih menunjukkan peningkatan kurva yang berarti bahwa masih ada spiramisin yang dilepaskan.



Keterangan: (■) pH 2, (■) pH 5,5, dan (■) pH 8

Gambar 4.6 Grafik persentase pelepasan spiramisin dari liposom formula 2 selama 8 jam

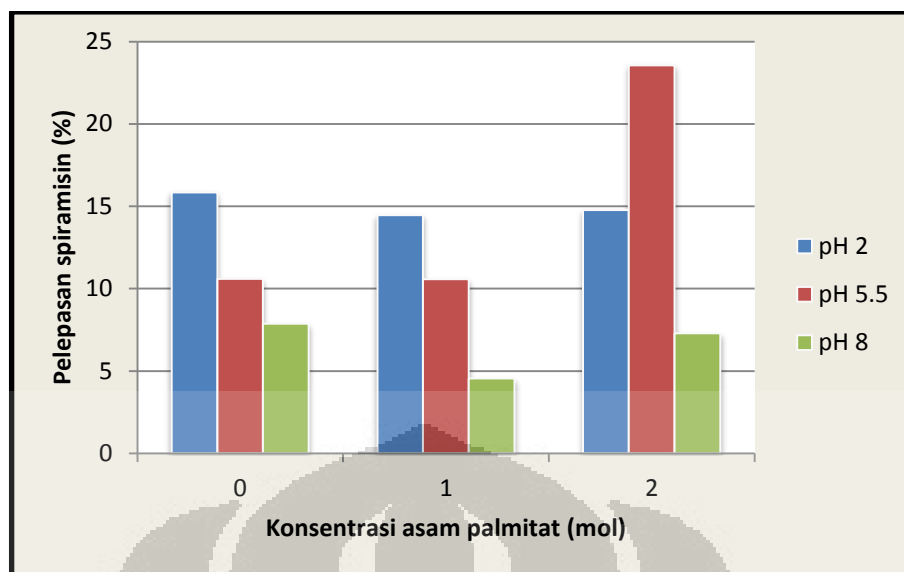
Hasil perbandingan uji sensitivitas pH pada formula 1, 2, dan 3 menunjukkan bahwa adanya penambahan asam palmitat pada formula 2 dan formula 3 dapat meningkatkan kestabilan liposom sehingga spiramisin yang dilepaskan menurun seiring bertambahnya asam palmitat. Pecahnya liposom formula 2 dan formula 3 pada kondisi medium pH asam disebabkan oleh terprotonasinya asam palmitat pada pH di bawah 7, tetapi pada pH 7-9 asam palmitat dapat membentuk lamelar lipid bilayer. Hal tersebut ditunjukkan dengan grafik presentase pelepasan spiramisin tertinggi dilepaskan pada pH 2 seperti pada Gambar 4.6. Pada pH 8, pelepasan yang dihasilkan lebih sedikit daripada pH asam. Namun, pada formula 3 pelepasan spiramisin terbanyak yaitu pada pH 5,5 dibandingkan pH 2 dan pH 8. Grafik hubungan pH medium dengan persentase pelepasan obat selama 8 jam dari ketiga formula liposom dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Keterangan: (■)Formula 1, (■)Formula 2, (■)Formula 3

Gambar 4.7 Grafik hubungan pH medium dengan persentase pelepasan spiramisin selama 8 jam dari ketiga formula liposom

Dari hasil uji pada formula 1, formula 2 dan formula 3 terlihat bahwa pada kondisi asam spiramisin yang dilepaskan lebih banyak dibandingkan kondisi basa, hal ini sejalan dengan tujuan dibuatnya liposom sensitif pH yaitu dapat stabil pada pH fisiologis tubuh namun akan rusak dan melepaskan zat aktifnya pada kondisi lingkungan yang asam. Contoh perhitungan persentase spiramisin yang dilepaskan liposom selama 8 jam dapat dilihat pada Lampiran 26.



Gambar 4.8 Grafik hubungan konsentrasi asam palmitat yang ditambahkan dengan persentase pelepasan obat selama 8 jam pada tiga kondisi pH

Berdasar konsentrasi asam palmitat yang ditambahkan, pada formula 3 dengan penambahan 2 mol asam palmitat, spiramisin banyak dilepaskan pada pH 5,5 sekitar 23%. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan formula 1 dan formula 2 dengan pH yang sama. Konsentrasi dua mol asam palmitat pada pH 8 spiramisin yang dilepaskan meningkat dibanding konsentrasi satu mol asam palmitat yang diduga karena liposom tidak terbentuk secara sempurna sehingga tidak memperlihatkan profil sensitivitas pH yang sesuai. Grafik hubungan konsentrasi asam palmitat yang ditambahkan dengan persentase pelepasan obat selama 8 jam pada tiga kondisi pH dapat dilihat pada Gambar 4.8.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Asam palmitat yang ditambahkan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap persentase pelepasan obat dari liposom yang mengandung spiramisin pada berbagai kondisi pH.
2. Hasil evaluasi persentase penyerapan spiramisin oleh liposom berturut-turut yaitu 79,31%; 82,22%; dan 81,94%.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan optimasi terhadap persentase asam palmitat dan komposisi bahan penyusun lain yang ditambahkan ke dalam formula untuk menghasilkan liposom yang stabil terhadap pH netral dan basa, serta sensitif terhadap pH asam.
2. Perlu dilakukan orientasi dan optimasi terhadap waktu pelepasan obat yang optimum pada uji sensitivitas pH.

DAFTAR PUSTAKA

- Barenholz, Y., dan Crommelin, D. J. (1994). Liposome as Pharmaceutical Dosage Forms. Dalam J. Swarbrick, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Third Edition Volume 9*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Benita, S. (1996). *Microencapsulation Methods and Industrial Application*. New York: Marcel Dekker. 259-290.
- Biju, S. S., Talegaonkar, S., Mishra, P. R., dan Khar, R. K. (2006). Vesicular System: An Overview. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 142-144.
- Crommelin, D. J. A., Hennink, W. E., dan Storm, G. (2001). Drug Targeting System: Fundamentals and Applications to Parenteral Drug Delivery. . Dalam L. S. Hillery, *Drug Delivery and Targeting for Pharmacist and Pharmaceutical Scientists*. London: Taylor dan Francis.
- Cui, Zhong-Kai., Bastiat, Guillaume., Jin, Chester., Keyvanloo, Amir., Lafleur, Michael. (2010). Influence of The Nature of The Sterol On The Behavior of Palmitic Acid/Sterol Mixtures and Their Derived Liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Farmakope Indonesia Edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan.
- Drulis-Kawa, Z., dan Dorotkiewicz-Jach, A. (2009). Liposome as Delivery Systems for Antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics* 387, 187-198.
- Fang, Jia-You, *et al.* (2005). Enhancement of The Transdermal Delivery of Catechins by Liposomes Incorporating Anionic Surfactants and Ethanol. *International Journal of Pharmaceutics*, 310, 131-138.
- Gregoriadis, Gregory. (1984). *Liposom Technology Volume I, Preparation of Liposomes*. Florida: CRC Press.
- Gulati, M., Grover, M., Singh, S., dan Singh, M. (1997). Lipophilic Drug Derivatives in Liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 165, 129-168.
- Hope, M. J., Nayar, R., Mayer, L. D., dan Cullis, P. R. (1993). Reduction of Liposome Size and Preparation of Unilamellar Vesicles by Extrusion

Techniques. Dalam G. Gregoriadis, *Liposome Technology Second Edition Volume I*. New York: Informa Healthcare.

Jones, M. N. (2005). Use of Liposomes to Deliver Bactericides to Bacterial Biofilms. Dalam N. Duzgunes, *Method in Enzymology Liposomes Part E Volume 391*. London: Elsevier Inc.

Kaparissides, C., Alexandridou, Kotti dan Chaitidou. (2006). Recent Advance in Novel Drug Delivery Systems. *Journal of Nanotechnology Online*.

Karki, R., Subramanya, G., dan Udupa, N. (2009). Formulation and Evaluation of Coencapsulated Rifampicin and Isoniazid Liposomes Using Different Lipids. *Acta Pharmaceutica Scientia 51*, 177-188.

Kurkani, S.B., Singh, M., Betagent, G.V. (1997). Encapsulation, Stabilizing and in vivo Release Characteristic of Liposome form of Colchines. *Journal of Pharmacology*, 49, 491-495.

Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Sfar, S., Charcosset, C., dan Fessi, H. (2011). Liposome Preparation Using a Hollow Fiber Membrane Contractor. *International Journal of Pharmaceutics 415*, 53-61.

Lasic, D. D. (1995). Mechanism of Liposome Formation. *Journal of Liposome Research 5*, 431-441.

Lasic, D. D. (1997). *Liposome in Gene Delivery*. New York: CRC Press.

Martin, F.J. (1990). Pharmaceuticals Manufacturing of Liposomes. Dalam P. Tyle, *Specialized Drug Delivery Systems Manufacturing and Production Technology*. New York: Marcel Dekker. 278-294.

Mozafari, M. R. (2005). Liposome: An Overview of Manufacturing Techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters 10*, 711-719.

O'Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E., Obenchain, J. R., Jr., Gallipeau, J. A. R., D'Arecca, M. A. , dan Budavari, S. (2001). *The Merck Index 13th Ed.* New Jearsey: Merck dan Co., Inc. Whitehouse Station.

Ramadhani, Hanifah. (2011). Pengaruh Penambahan Asam Oleat Terhadap Sensitivitas Liposom Pada Berbagai Kondisi pH dan Penjerapan Spiramisin oleh Liposom. *Skripsi Sarjana Farmasi*. Depok: FMIPA UI.

- Rane, S., & Prabhakar, B. (2009). Influence of Liposome Composition on Paclitaxel Entrapment and pH Sensitivity of Liposome. *International Journal of PharmTech Research* , 1 (3), 914-917.
- Reddy, P. D., dan Swarnalatha, D. (2010). Recent Advancer in Novel Drug Delivery Systems. *International Journal of PharmTech Research* 2, 2025-2027.
- Ropert, C. (1999). Liposomes as a Gene Delivery System. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* , 32 (2), 163-169.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., dan Quinn, M. E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients Sixth Edition*. London: Pharmaceutical Press.
- Scherphof, G. L., Daemen, T., Spanjer, H. H., dan Roerdink, F. H. (1987). Liposomes in Chemo and Immunotherapy of Cancer. *Lipids* 22, 891-896.
- Schroeder, A., Kost, J., & Barenholz, Y. (2009). Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* , 1-16.
- Sharma, A., dan Sharma, U. S. (1997). Liposomes in Drug Delivery: Progress and Limitations. *International Journal of Pharmaceutics* 154, 123-140.
- Setiabudy, Rianto. (2007). Anti Mikroba Lain. Dalam Farmakologi dan Terapi. Jakarta: Gaya Baru, 723-726.
- Shen, Y., Huadong, T., Radosz, M., Kirk., E. V., Murdoch, W. J. (2008). pH-Responsive Nanoparticles for Cancer Drug Delivery. Dalam Kewal K. Jain (Ed.), *Methods in Molecular Biology: Drug Delivery Systems* (Vol. 437). New York: Humana Press.
- Slepshkin, V. E. (1997). Sterically Stabilized pH-Sensitive Liposomes. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 2382-2388.
- Sulkowski, W. W., Pentak, D., Nowak, K., dan Sulkowska, A. (2005). The Influence of Themperature, Cholesterol Content and pH on Liposome Stability. *Journal of Molecular Structure*, 737-747.
- Swarbrick, J. (2007). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Informa Healthcare USA, Inc.

- Sweetman, S. C. (2009). *Martindale The Complete Drug Reference 36 Edition*. London: Pharmaceutical Press.
- Torchillin, V. P., Lukyanov, A. N., dan Klibanov, A. L. (1992). Interaction Between Oleic Acid-Containing pH-Sensitive and Plain Liposome. *Federation of European Biochemical Societies* 305, 185-188.
- Tsai, W.C., Li, W.C., Yin, H.Y., Yu, M.C., Wen, H.W. (2011). Constructing Liposomal Nanovesicles of Ginseng Extract Against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage to L929 Cells. *Journal Food Chemistry*, 132, 744-751.
- Venuganti, V. V., dan Perumal, O. P. (2009). Nanosystem for Dermal and Transdermal Drug Delivery. Dalam Y. P. Thassu, *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization* (hal. 126). New York: Informa Healthcare.
- 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.
- Woodbury, D. J., Richardson, E. S., Grigg, A. W., Welling, R. D., Knudson, B. H. (2006). Reducing Liposome Size With Ultrasound : Bimodal Size Distribution. *Journal of Liposomes* 16, 57-80.
- Wu, J., Zhao, X., Lee, R.J. (2007). Lipid-based Nanoparticulate Drug Delivery Systems. Dalam e. Deepak Thassu, *Nanoparticulate Drug Delivery Systems* (Vol. 166, hal. 89-92). New York: Informa Health Care USA.
- Zignani, M., Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., dan Leroux, J. P. (1999). In Vitro Characterization of A Novel Polymeric-Based pH-Sensitive Liposome System. *Biochimica et Biophysica Acta*.

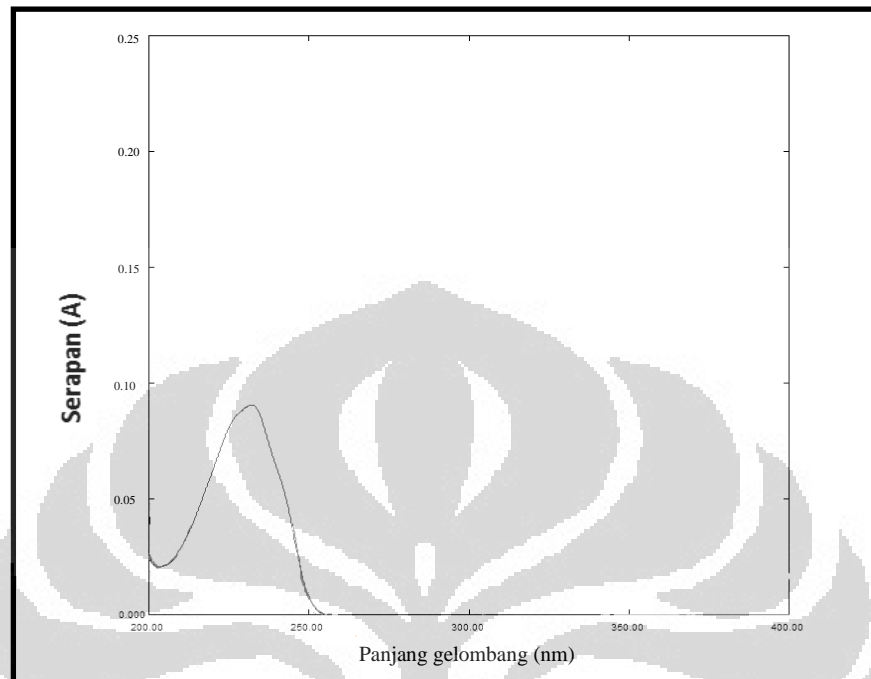


LAMPIRAN

Daftar Lampiran

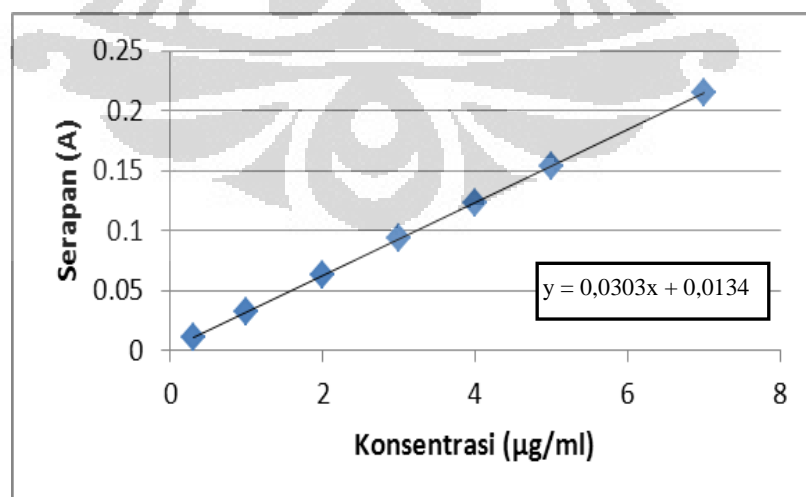
Lampiran Gambar	1-16
Lampiran Tabel	17-23
Lampiran Skema Pembuatan Liposom	24
Lampiran Contoh Perhitungan	25-26
Lampiran Sertifikat Analisis	27-30

Lampiran 1. Spektrum serapan spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 pada konsentrasi 3 $\mu\text{g/ml}$

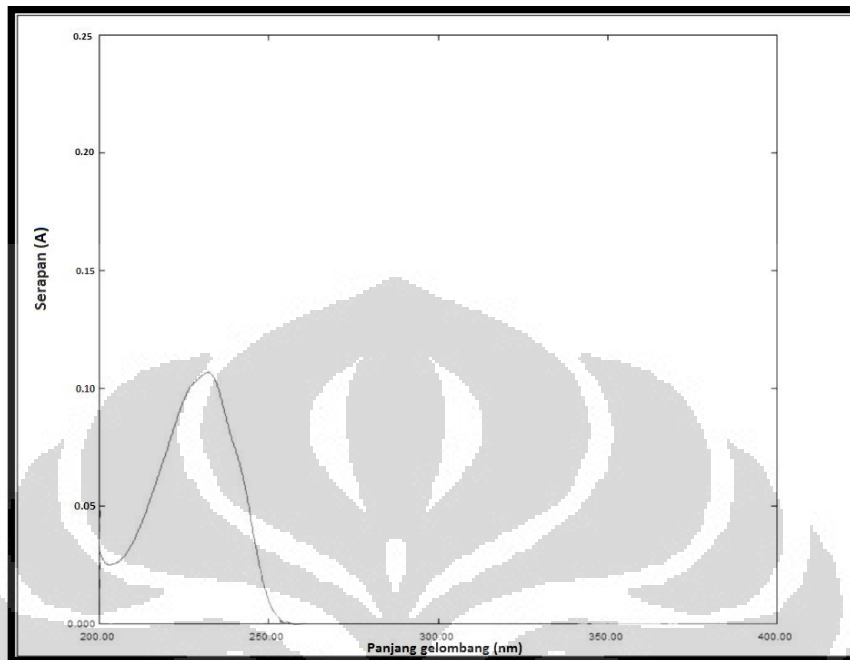


Keterangan : Spektrum serapan spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 pada konsentrasi 3 $\mu\text{g/ml}$ dengan panjang gelombang maksimum 231,5 nm

Lampiran 2. Kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 pada panjang gelombang 231,5 nm

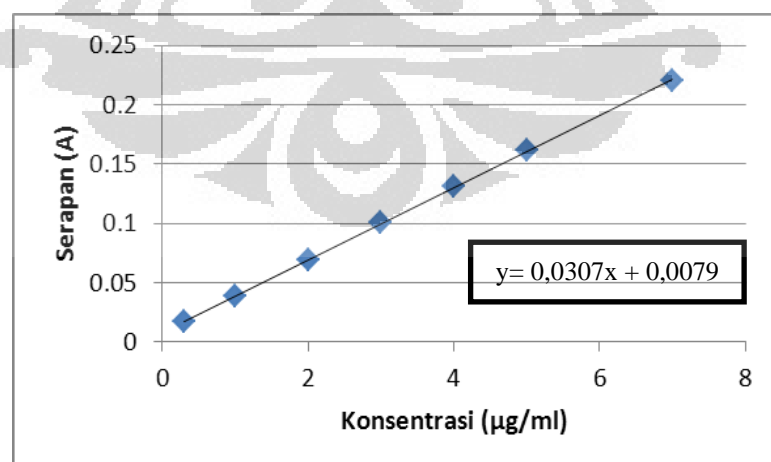


Lampiran 3. Spektrum serapan spiramisin dalam larutan dapar klorida pH 2 pada konsentrasi 3 $\mu\text{g/ml}$

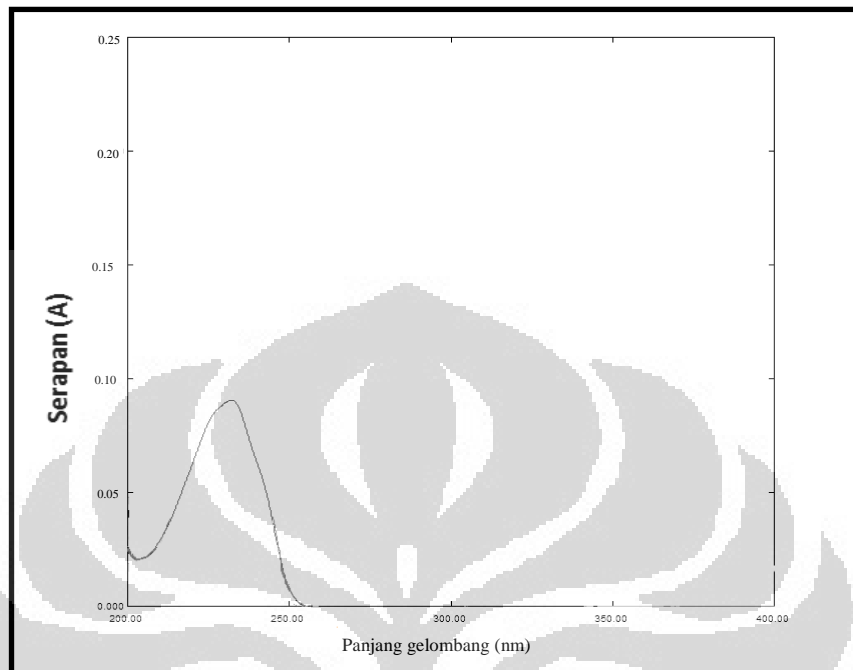


Keterangan : Spektrum serapan spiramisin dalam larutan dapar klorida pH 2 pada konsentrasi 3 $\mu\text{g/ml}$ dengan panjang gelombang maksimum 231,5 nm

Lampiran 4. Kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar klorida pH 2 pada panjang gelombang 231,5 nm

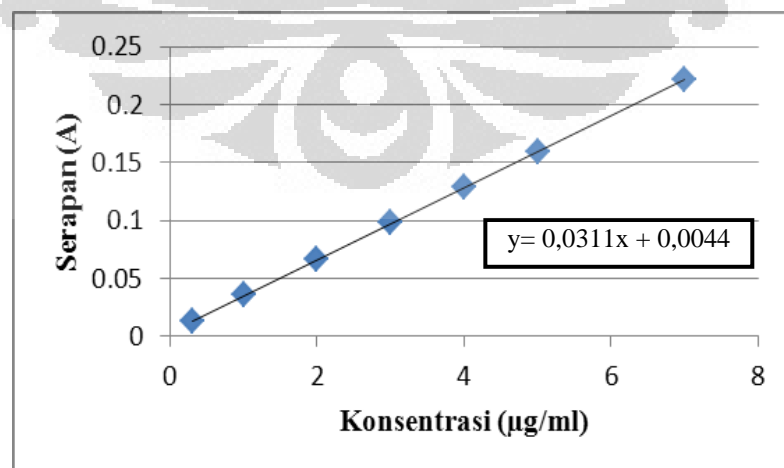


Lampiran 5. Spektrum serapan spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 5,5 pada konsentrasi 3 $\mu\text{g/ml}$

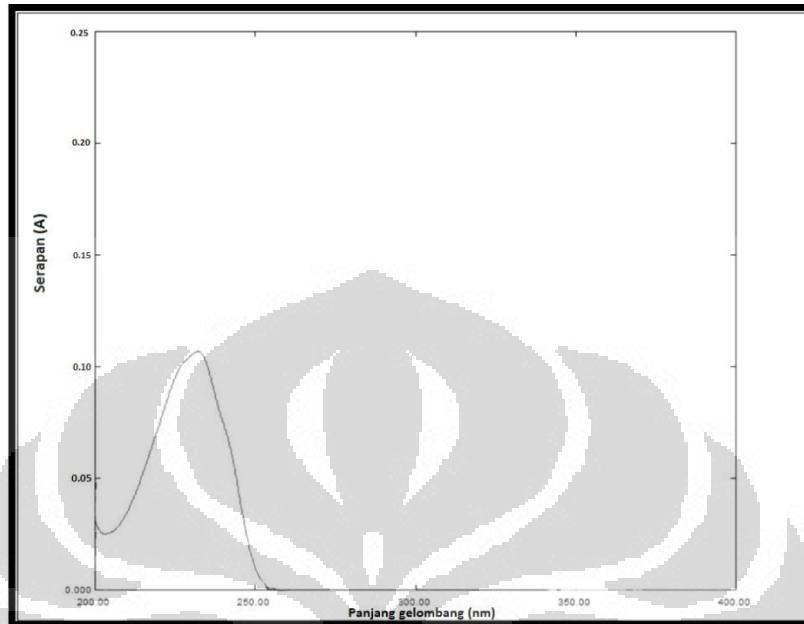


Keterangan : Spektrum serapan spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 5,5 pada konsentrasi 3 $\mu\text{g/ml}$ dengan panjang gelombang maksimum 231,5 nm

Lampiran 6. Kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 5,5 pada panjang gelombang 231,5 nm

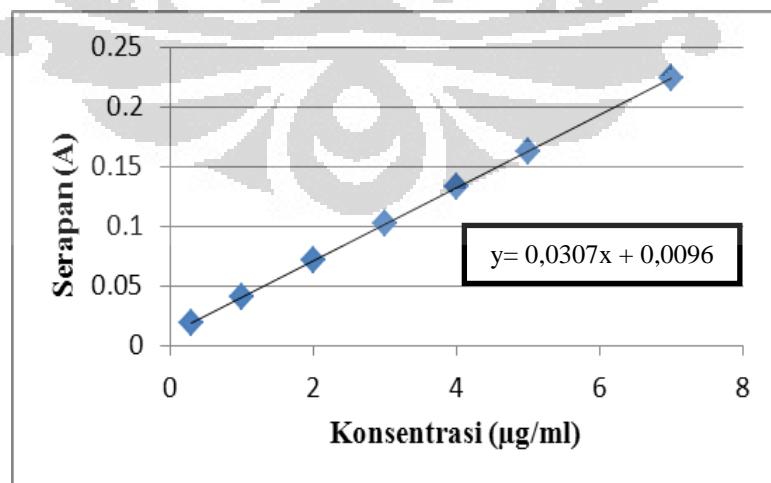


Lampiran 7. Spektrum serapan spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 8 pada konsentrasi 3 $\mu\text{g/ml}$

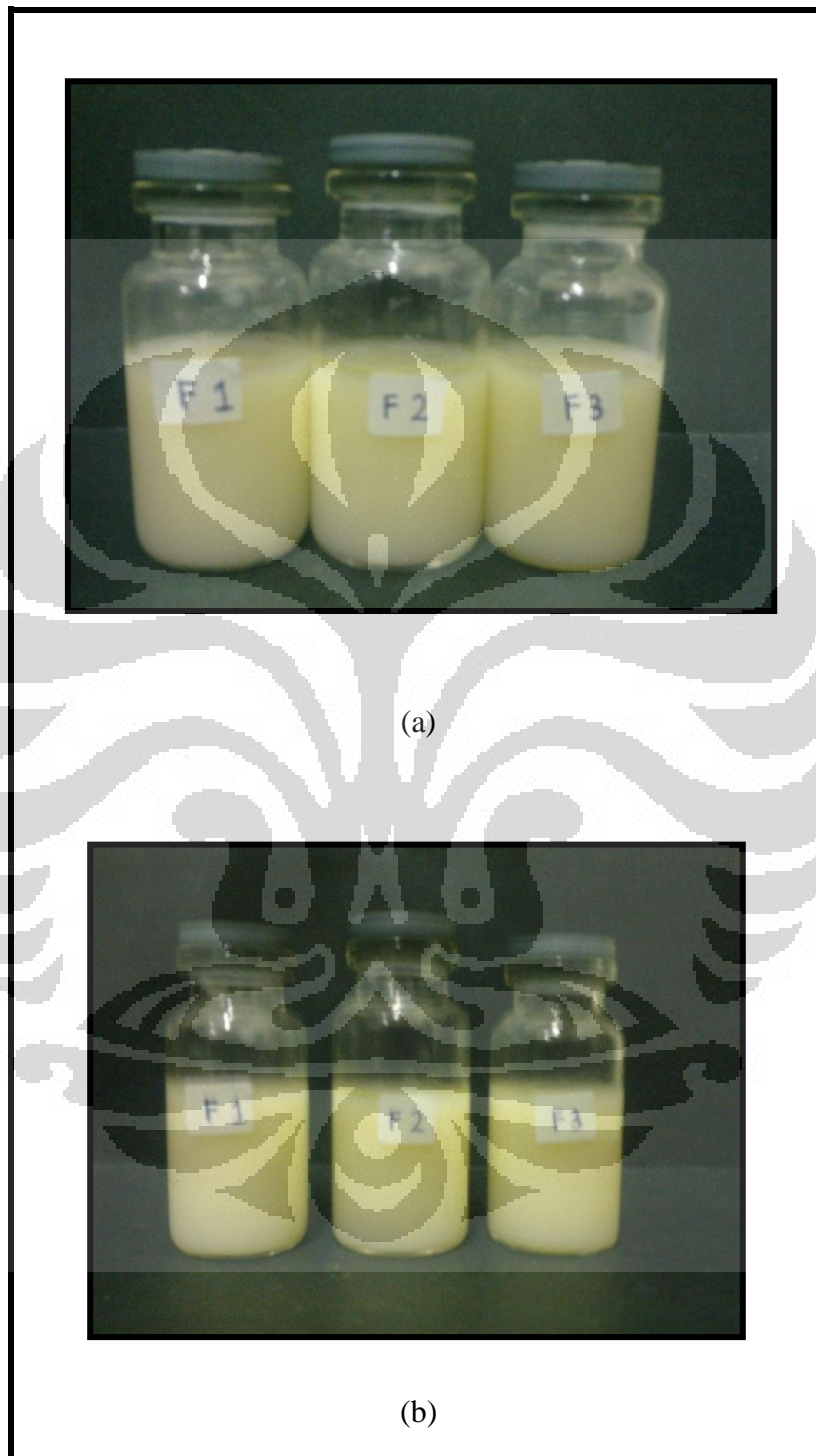


Keterangan : Spektrum serapan spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 8 pada konsentrasi 3 $\mu\text{g/ml}$ dengan panjang gelombang maksimum 231,5 nm

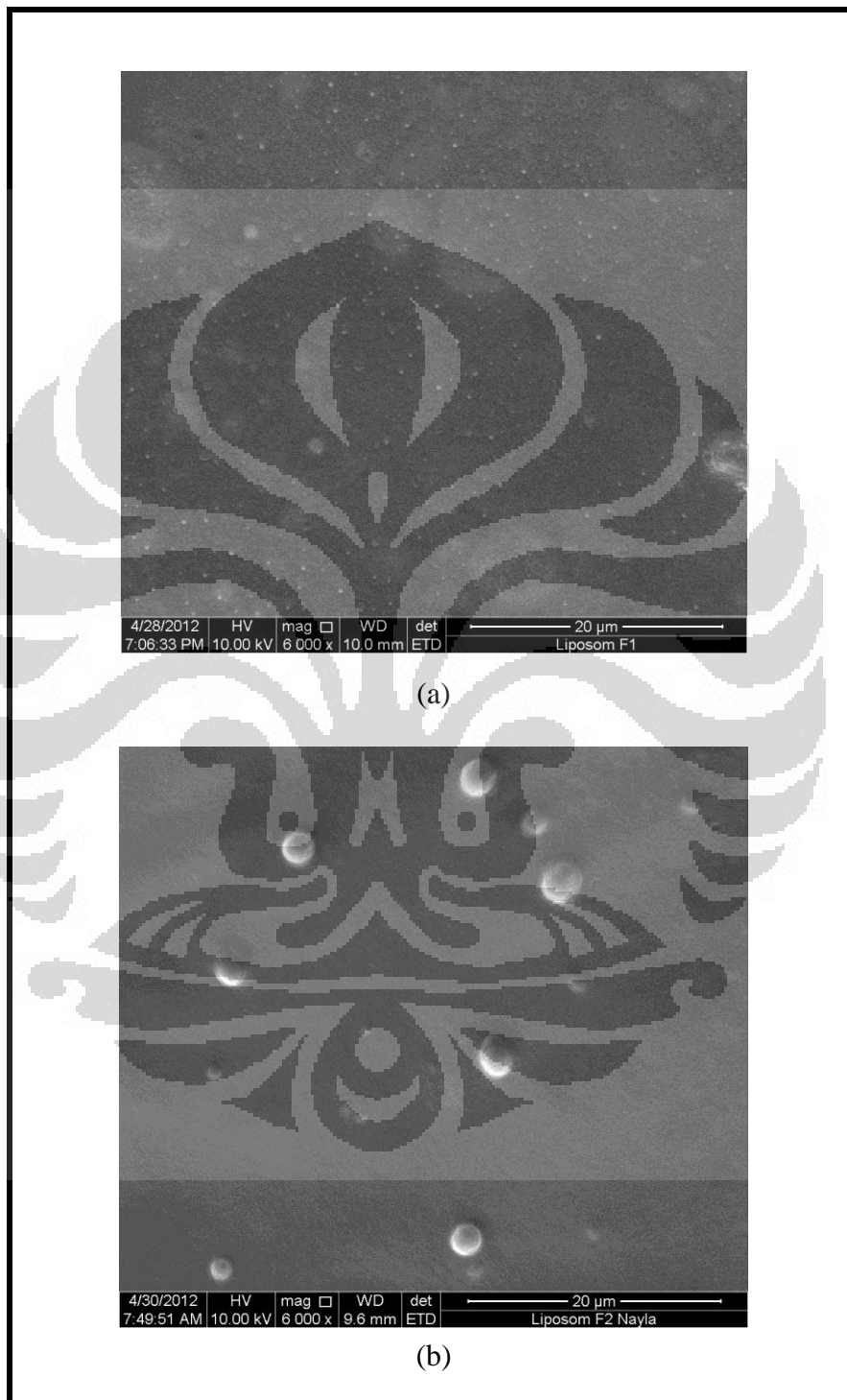
Lampiran 8. Kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 8 pada panjang gelombang 231,5 nm



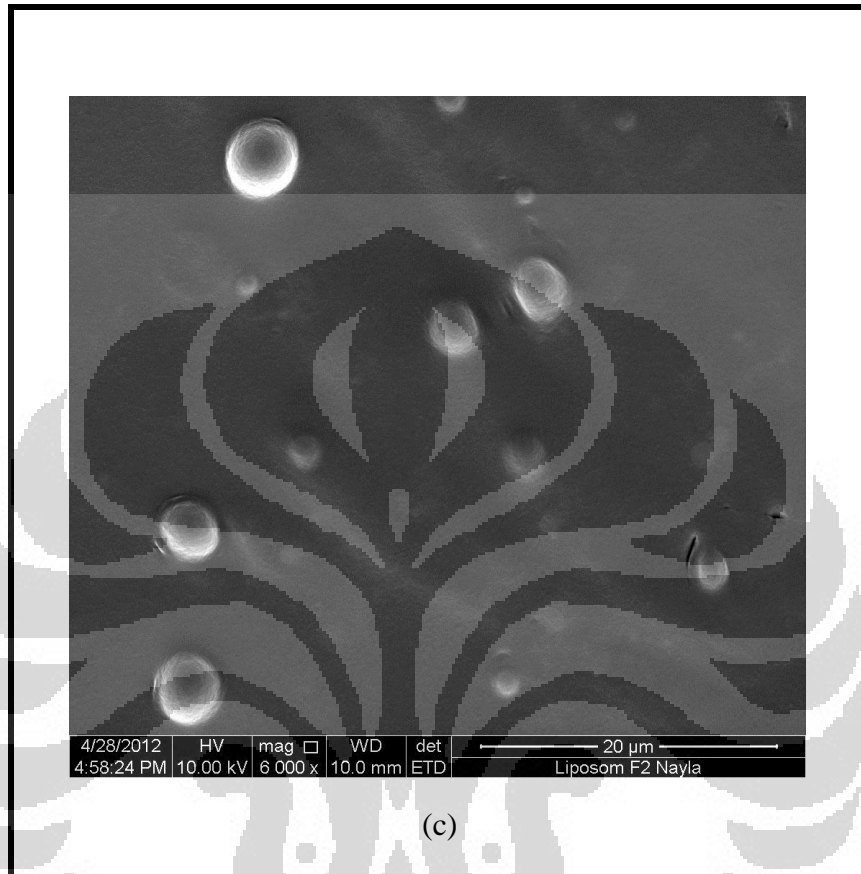
Lampiran 9. Penampilan suspensi liposom (a) sebelum diultrasonikasi dan (b) setelah diultrasonikasi selama 40 menit



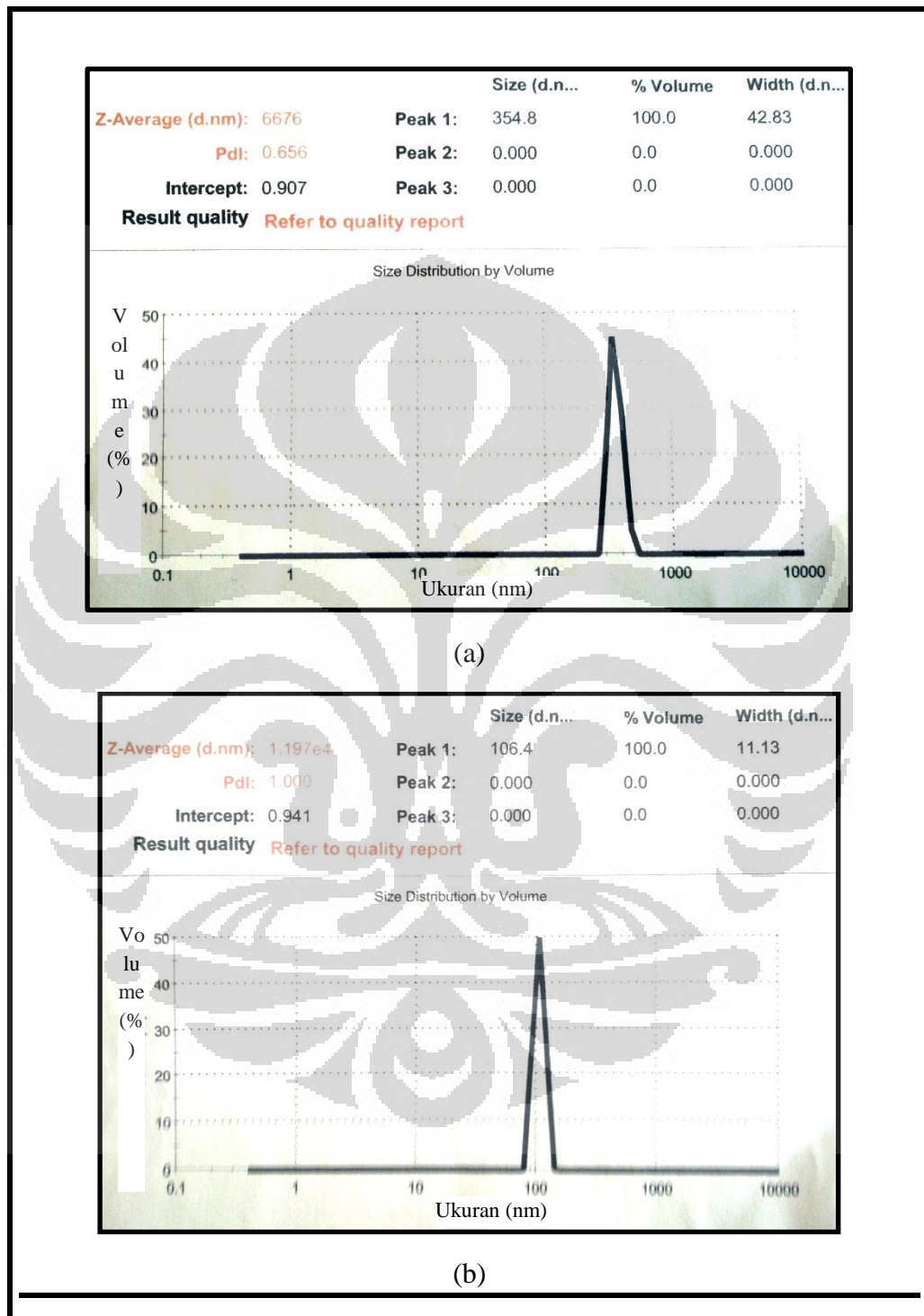
Lampiran 10. Morfologi liposom (a) formula 1, (b) formula 2, dan (c) formula 3 setelah diultrasonikasi 40 menit, hasil pengukuran dengan SEM digital zoom 6000x.



(Lanjutan Lampiran 10. Morfologi liposom (c) formula 3 setelah diultrasonikasi 40 menit, hasil pengukuran dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) digital zoom 6000x)



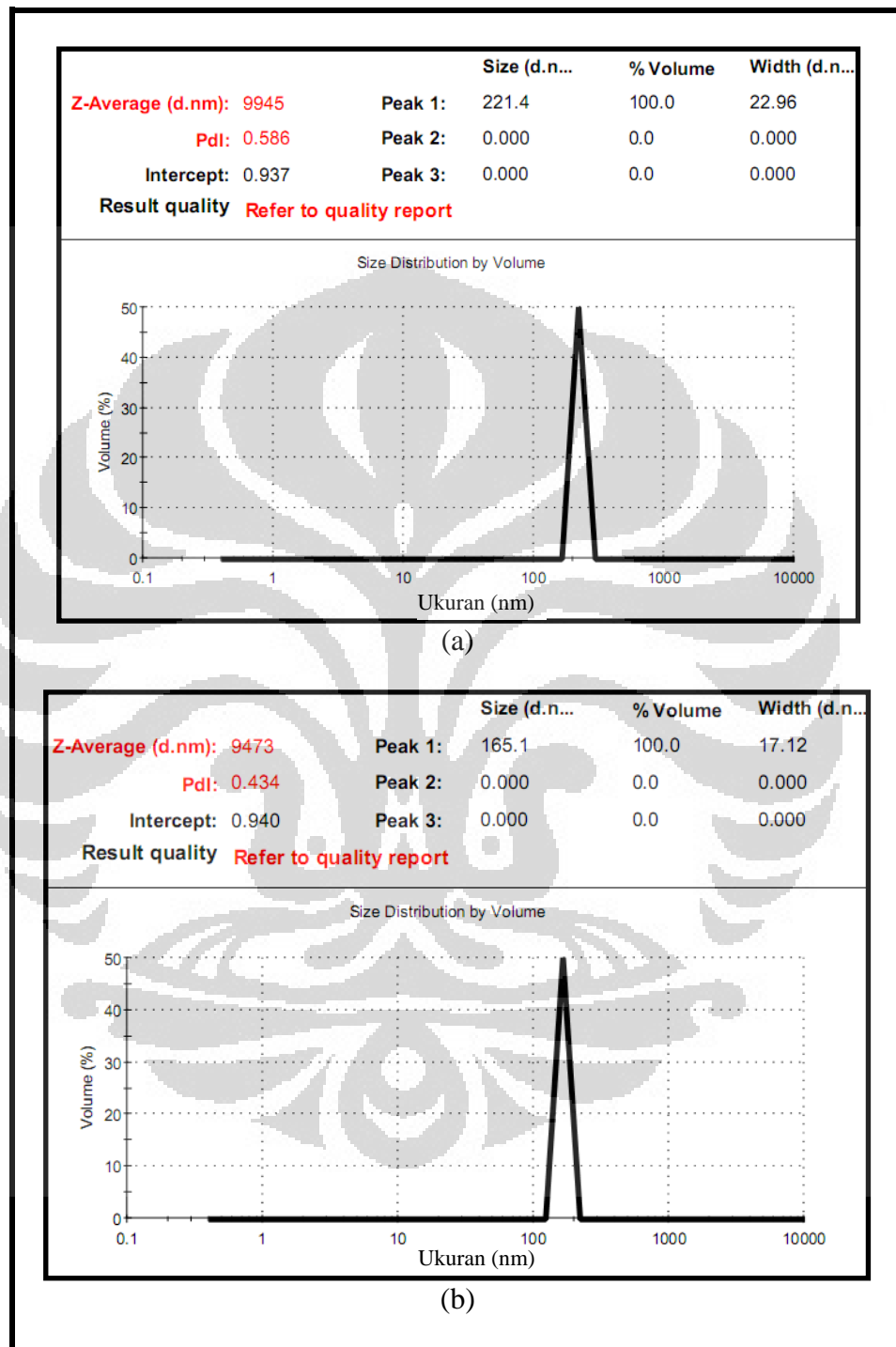
Lampiran 11. Hasil pengukuran *Particle Size Analyzer* formula 1 (a) sebelum diultrasonikasi dan (b) setelah diultrasonikasi 40 menit



Keterangan: (a) Hasil pengukuran *Particle Size Analyzer* formula 1 sebelum diultrasonikasi sebesar 354,8 nm dengan persentase volume 100%

(b) Hasil pengukuran *Particle Size Analyzer* formula 1 setelah diultrasonikasi 40 menit sebesar 106,4 nm dengan persentase volume 100%

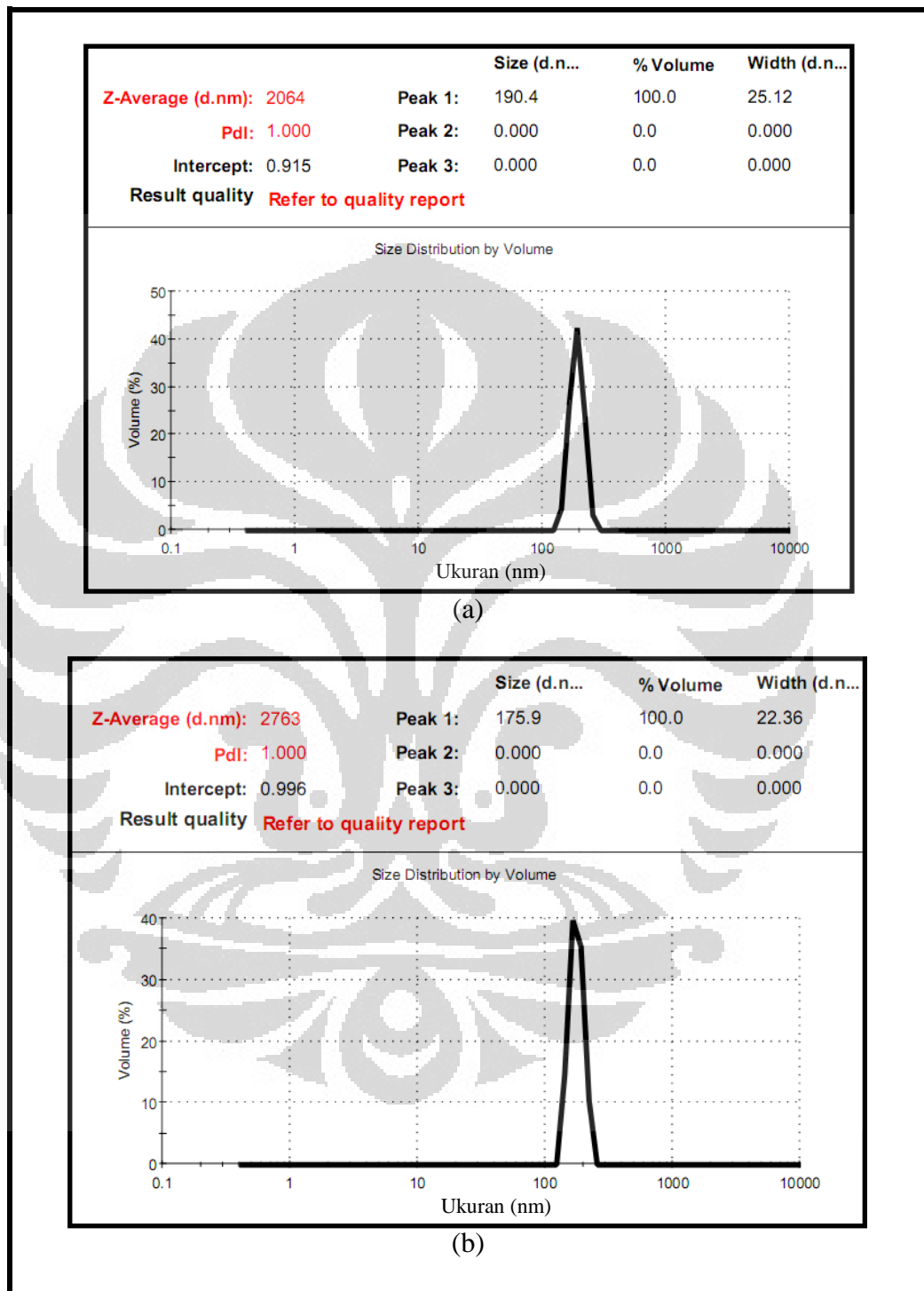
Lampiran 12. Hasil pengukuran *Particle Size Analyzer* formula 2 (a) sebelum diultrasonikasi dan (b) setelah diultrasonikasi 40 menit



Keterangan: (a) Hasil pengukuran *Particle Size Analyzer* formula 2 sebelum diultrasonikasi sebesar 354,8 nm dengan persentase volume 100%

(b) Hasil pengukuran *Particle Size Analyzer* formula 2 setelah diultrasonikasi 40 menit sebesar 106,4 nm dengan persentase volume 100%

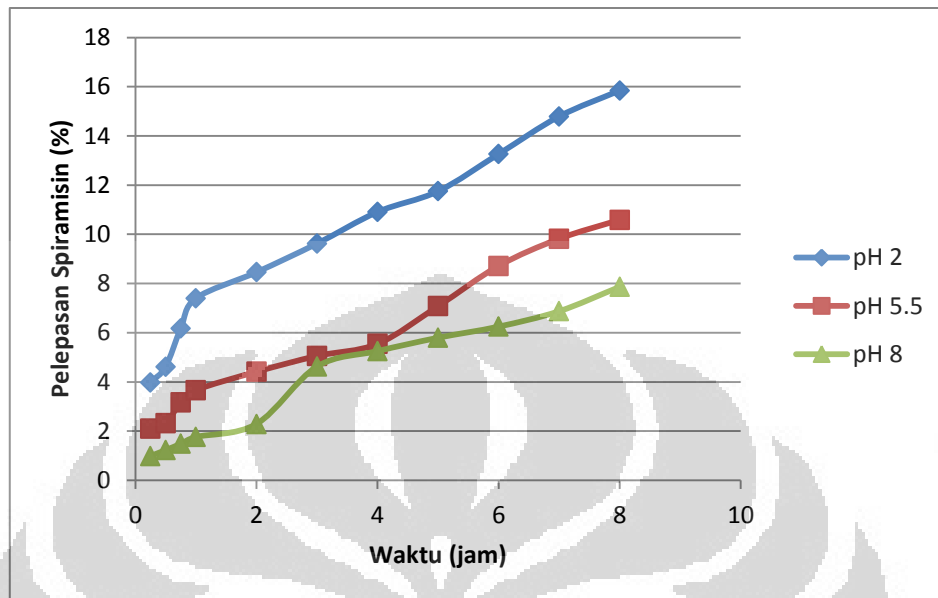
Lampiran 13. Hasil pengukuran *Particle Size Analyzer* formula 3 (a) sebelum diultrasonikasi dan (b) setelah diultrasonikasi 40 menit



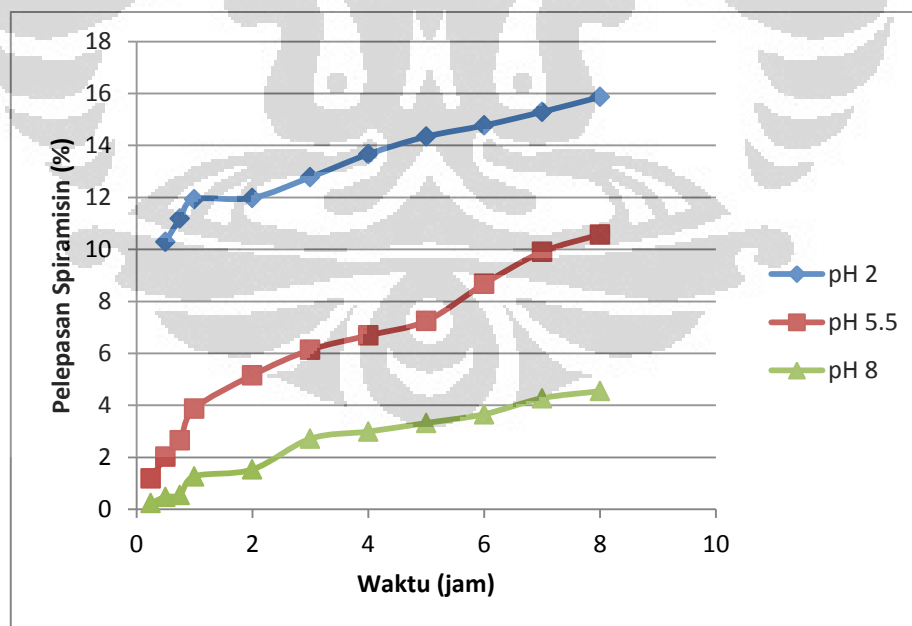
Keterangan: (a) Hasil pengukuran *Particle Size Analyzer* formula 3 sebelum diultrasonikasi sebesar 354,8 nm dengan persentase volume 100%.

(b) Hasil pengukuran *Particle Size Analyzer* formula 3 setelah diultrasonikasi 40 menit sebesar 106,4 nm dengan persentase volume 100%.

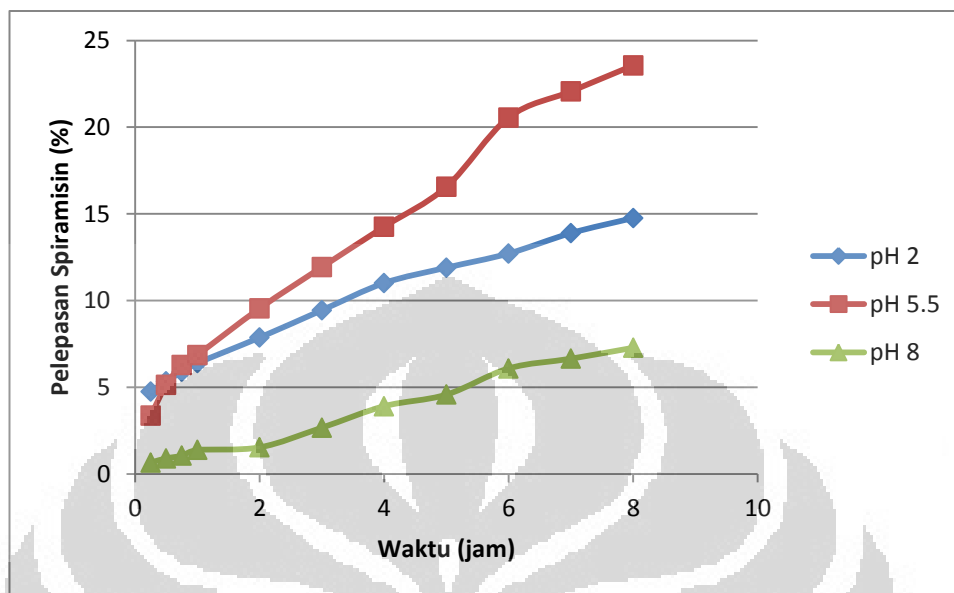
Lampiran 14. Grafik persentase pelepasan spiramisin dari liposom formula 1 selama 8 jam



Lampiran 15. Grafik persentase pelepasan spiramisin dari liposom formula 2 selama 8 jam



Lampiran 16. Grafik persentase pelepasan spiramisin dari liposom formula 3 selama 8 jam



Lampiran 17. Data konsentrasi dan serapan kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar pH 7,4

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan (A)
0,3	0,0111
1,0	0,0324
2,0	0,0627
3,0	0,0930
4,0	0,1234
5,0	0,1537
7,0	0,2144

$$y = 0,0303x + 0,0020$$

$$r = 0,9999$$

Lampiran 18. Data konsentrasi dan serapan kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar pH 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan (A)
0,3	0,0171
1,0	0,0387
2,0	0,0695
3,0	0,1003
4,0	0,1311
5,0	0,1614
7,0	0,2200

$$y = 0,0303x + 0,0085$$

$$r = 0,9999$$

Lampiran 19. Data konsentrasi dan serapan kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar pH 5,5

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan (A)
0,3	0,0137
1,0	0,0355
2,0	0,0666
3,0	0,0977
4,0	0,1288
5,0	0,1598
7,0	0,2221

$$y = 0,0311x + 0,0044$$

$$r = 0,9999$$

Lampiran 20. Data konsentrasi dan serapan kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar pH 8

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan (A)
0,3	0,0188
1,0	0,0403
2,0	0,0710
3,0	0,1017
4,0	0,1324
5,0	0,1630
7,0	0,2245

$$y = 0,0307x + 0,0095$$

$$r = 0,9999$$

Lampiran 21. Data hasil evaluasi pelepasan spiramisin pada pH 2

Jam ke-	Tabel data evaluasi pelepasan spiramisin pH 2		
	Formula 1	Formula 2	Formula 3
0.25	3,97 ± 0,60	10,87 ± 0,50	4,74 ± 0,40
0.5	4,61 ± 0,53	11,89 ± 0,42	5,34 ± 0,37
0.75	6,17 ± 0,10	12,28 ± 0,05	5,88 ± 0,33
1	7,40 ± 0,36	12,31 ± 0,30	6,39 ± 0,32
2	8,45 ± 0,50	12,98 ± 0,002	7,86 ± 1,01
3	9,62 ± 0,59	13,82 ± 0,03	9,44 ± 0,67
4	10,90 ± 0,99	13,87 ± 0,55	11,01 ± 1,15
5	11,75 ± 1,06	14,41 ± 0,64	11,89 ± 1,11
6	13,26 ± 0,97	15,08 ± 0,48	12,71 ± 0,89
7	14,79 ± 1,51	15,23 ± 0,74	13,89 ± 1,13
8	15,84 ± 0,97	15,26 ± 1,13	14,76 ± 1,13

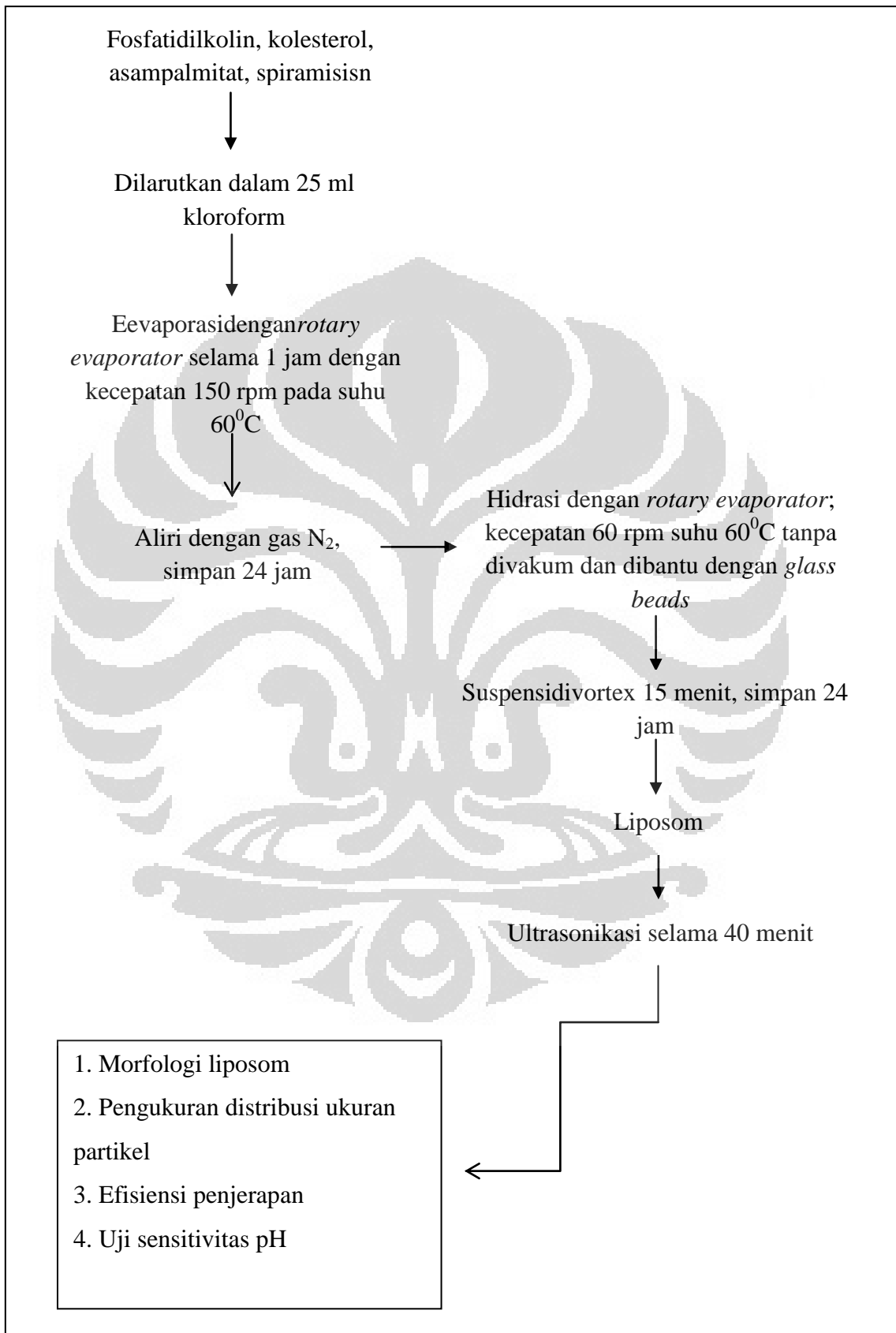
Lampiran 22. Data hasil evaluasi pelepasan spiramisin pada pH 5,5

Jam ke-	Tabel data evaluasi pelepasan spiramisin pH 5,5		
	Formula 1	Formula 2	Formula 3
0.25	2,10 ± 0,66	1,18 ± 0,36	3,36 ± 1,11
0.5	2,32 ± 0,84	2,02 ± 0,08	5,13 ± 0,65
0.75	3,16 ± 1,06	2,65 ± 0,33	6,28 ± 0,54
1	3,66 ± 1,14	3,87 ± 0,46	6,86 ± 1,30
2	4,41 ± 1,03	5,16 ± 0,77	9,54 ± 0,06
3	5,05 ± 1,18	6,13 ± 0,95	11,93 ± 0,87
4	5,54 ± 1,19	6,68 ± 0,59	14,25 ± 1,79
5	5,54 ± 0,54	7,24 ± 0,22	16,56 ± 2,07
6	7,08 ± 0,27	8,67 ± 0,01	20,55 ± 3,85
7	9,81 ± 0,06	9,90 ± 0,14	22,06 ± 2,70
8	10,59 ± 0,10	10,57 ± 0,49	23,55 ± 0,85

Lampiran 23. Data hasil evaluasi pelepasan spiramisin pada pH 8

Tabel data evaluasi pelepasan spiramisin pH 8			
Jam ke-	Formula 1	Formula 2	Formula 3
0.25	0,99 ± 0,05	0,23 ± 0,16	0,66 ± 0,29
0.5	1,23 ± 0,10	0,48 ± 0,05	0,90 ± 0,29
0.75	1,48 ± 0,08	0,55 ± 0,16	1,05 ± 0,48
1	1,76 ± 0,02	1,26 ± 0,13	1,38 ± 0,58
2	2,29 ± 0,52	1,53 ± 0,24	1,53 ± 1,17
3	4,62 ± 0,03	2,71 ± 0,36	2,67 ± 0,64
4	5,25 ± 0,71	2,99 ± 0,09	3,91 ± 0,08
5	5,79 ± 0,11	3,32 ± 0,16	4,57 ± 1,60
6	6,24 ± 1,19	3,65 ± 0,15	6,09 ± 0,96
7	6,87 ± 1,17	4,27 ± 0,02	6,65 ± 1,00
8	7,86 ± 0,85	4,54 ± 0,04	7,27 ± 0,97

Lampiran 24. Skema pembuatan liposom menggunakan metode hidrasi lapis tipis



Lampiran25.Contoh perhitungan efisiensi penjerapan spiramisin Formula 1

Hasil pengukuran serapan 3,3113 A lalu diambil 4 ml →masukkan ke labu ukur 100 ml, ad kan sampai batas dan didapat serapan 3,2148. Kemudian diambil 3 ml →masukkan ke labu ukur 25 ml, ad kan sampai batas→didapat serapan 0,6281, masukkan ke dalam rumus:

$$C \text{ bebas} = \frac{(y - a) \times FP}{b \times 1000}$$

Persamaan kurvakalibrasi $y = 0,0303x + 0,0134$

Maka didapat:

$$\begin{aligned} C \text{ bebas} &= \frac{(0,6281 - 0,0134) \times 208,33}{0,0303 \times 1000} \\ &= 4,2197 \text{ mg} \end{aligned}$$

Konsentrasi total di dalam 50 ml suspensi liposom, dengan penimbangan 204,0 mg :

$$\frac{204,0 \text{ mg}}{50 \text{ ml}} = 4,08 \text{ mg/ml}$$

C total dalam 5 ml sampel = 4,08 mg/ml x 5 ml = 20,40 mg

$$Efisiensi \text{ penjerapan} = \frac{C \text{ total} - C \text{ bebas}}{C \text{ total}} \times 100\%$$

$$Efisiensi \text{ penjerapan} = \frac{20,40 - 4,2197}{20,40} \times 100\% = 79,31\%$$

Lampiran26. Contoh perhitungan persen pelepasan obat pada uji sensitivitas di pH 5,5 Formula 1 jam pertama (menit ke-15)

Hasil pengukuran serapan 0,0255 A dimasukkan ke dalam rumus:

$$Wt = \frac{(y - a) \times m \times \text{faktor pengenceran}}{b \times 1000}$$

Persamaan kurva kalibrasi $y = 0,0311x + 0,0044$

Maka didapat:

$$Wt = \frac{(0,0255 - 0,0044) \times 100 \times 5}{0,0311 \times 1000} = 0,3392 \text{ mg}$$

Spiramisin yang terjerap dalam 5 ml suspensi liposom:



$$79,31\% \times 204,0 = 161,04 \text{ mg}$$

$$\frac{161,04 \text{ mg}}{50 \text{ ml}} \times 5 \text{ ml} = 16,104 \text{ mg}$$


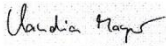
Persentase terdialisis:

$$\frac{0,3392}{16,104} \times 100\% = 2,104\%$$

Lampiran27. Sertifikat analisis egg fosfatidilkolin

SIGMA-ALDRICH®		 Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland Tel: +41 81 755 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 BCB03767 RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	YELLOW TO ORANGE	ORANGE
APPEARANCE (FORM)	POWDER TO SOLIDIFIED MASS OR CHUNKS	SOLIDIFIED MASS OR CHUNKS
PURITY (TLC AREA %)	≥ 55.0 %	76.5 %
WATER	≤ 2.0 %	0.7 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
QC RELEASE DATE	15/OCT/10	
		
Edeltraud Schwärzler, Manager Quality Control Buchs, Switzerland		
<small>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.</small>		

Lampiran 28. Sertifikat analisis kolesterol

SIGMA-ALDRICH		 SIGMA <small>Life Science</small> Riedstrasse 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:	C ₂₇ H ₄₆ O	
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, Manager Quality Control Steinheim, Germany	
<p><small>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.</small></p>		
Sigma-Aldrich	Certificate of Analysis - Product C75209 Lot STBB5512	Page 1 of 1

Lampiran29. Sertifikat analisis spiramisin

ORIGINAL

HENAN TOPFOND PHARMACEUTICAL CO., LTD.
河南天方药业股份有限公司

CERTIFICATE OF ANALYSIS
药品检验报告书


Ram 10
4.12

样品编号 (Serial No) : 2012620012

品名 Product Name	螺旋霉素 Spiramycin Base		
生产批号 Batch No.	120130190M	数量 Quantity	300KG
生产日期 MFG Date	01/2012	有效日期 EXP Date	12/2014
检验依据 According to	EP2002	报告日期 Report Date	Jan.30, 2012
检验项目 Test Items	规格 Specification	结果 Results	
性状 Characteristics	A slightly yellowish or white powder	Conform	
鉴别 Identification	(1) (2) (3)	Conform	
酸碱度 pH	8.5-10.5	9.8	
比旋度 Specific optical rotation	-85° - -80°	-82°	
相关物质 Related Substances	Largest impurity not more than 2.0%	1.7%	
干燥失重 Loss on drying	≤3.5%	1.4%	
重金属 Heavy metals	≤20ppm	Conform	
硫酸盐灰份 Sulphated ash	Not more than 0.1%	0.06%	
组份 Composition	Spiramycin I: not less than 80.0%	90.2%	
	Spiramycin II: not more than 5.0%	0.2%	
	Spiramycin III: not more than 10.0%	1.1%	
	Total Spiramycin I,II,III: not less than 90.0%	91.5%	
含量 Assay	Not less than 4100iu/mg calculated with reference to the anhydrous substances		4870iu/mg
结论 Conclusion	本品检验结果符合欧洲药典 2002 版标准 The above certificate of analysis is in compliance with EP2002.		


负责人: wang wenhua 复核员: 崔莹莹 检验员: 李丹 韩蜜
Quality manager: wang wenhua Rechecker: Cui Yingying Analyst: Li Dan Han Mi

PAGE : 1 OF 1



GLOBAL CHEMINDO MEGATRADING
reliable partner in raw material business

Lampiran30. Sertifikat analisis asam palmitat

Certificate of Analysis			
8.00508.1000 Palmitic acid for synthesis			
Batch		S6127708	
		Batch Values	
Assay (GC, area%)		98.7	%
Melting range			
lower value		62.8	°C
upper value		63.9	°C
Identity (IR)		passes test	
<i>Date of examination (DD.MM.YYYY):</i>	<i>19.08.2010</i>		
<i>Minimum shelf life (DD.MM.YYYY):</i>	<i>31.08.2015</i>		
		Dr. Wolfgang Bolkart	
		responsible laboratory manager quality control	
<i>This document has been produced electronically and is valid without a signature.</i>			
Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany); +49 6151 72-0		Page 1 of 1	
<small>8A-7 2087535/805538000/000000 V. 000 Date: 10.12.2010</small>			