



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENGARUH METODE EKSTRUSI BERTINGKAT DAN  
PENAMBAHAN ASAM PALMITAT TERHADAP  
KARAKTERISTIK DAN PENJERAPAN  
LIPOSOM SPIRAMISIN**

**SKRIPSI**

**KARTIKA WIDYANTY  
0806453636**

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



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENGARUH METODE EKSTRUSI BERTINGKAT DAN  
PENAMBAHAN ASAM PALMITAT TERHADAP  
KARAKTERISTIK DAN PENJERAPAN  
LIPOSOM SPIRAMISIN**

**SKRIPSI**

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

**KARTIKA WIDYANTY  
0806453636**

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

ii

## **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, 5 Juli 2012



Kartika Widyanty

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Kartika Widyanty

NPM : 0806453636

Tanda Tangan : 

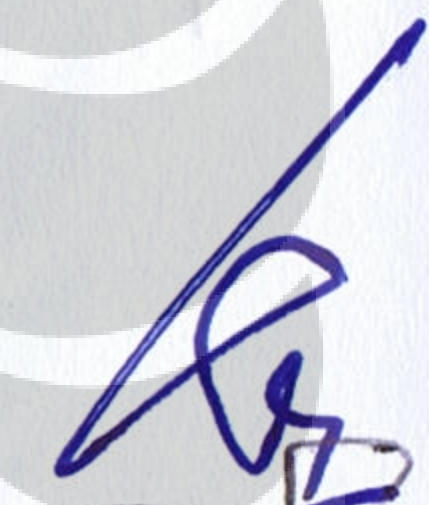
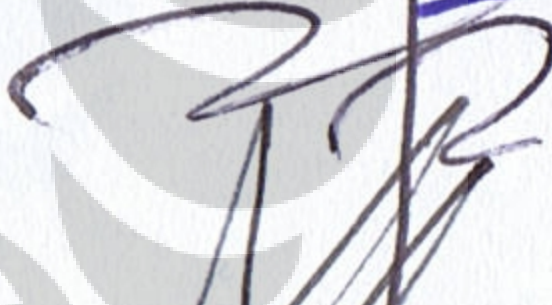
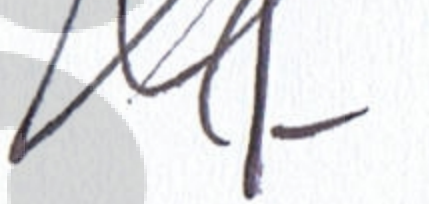
Tanggal : 5 Juli 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Kartika Widyanty  
NPM : 0806453636  
Program Studi : Sarjana Farmasi  
Judul Skripsi : Pengaruh Metode Ekstrusi Bertingkat dan Penambahan Asam Palmitat terhadap Karakteristik dan Penjerapan Liposom Spiramisin

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi S1 Reguler Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

### 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

Segala puji dan syukur hanyalah untuk Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan, bimbingan, doa dan dukungan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Dalam ruang terbatas ini, dengan segala kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan terima kasih dan rasa hormat kepada:

1. Dr. Iskandarsyah, M.S., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, pikiran, nasehat serta dukungannya baik moril dan materil dalam mengarahkan penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini;
2. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS. selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini;
3. Dr. Drs. Herman Suryadi M.S., Apt. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan banyak perhatian, saran, dan bantuannya selama ini;
4. Sutriyo, M.Si., Apt., selaku ketua Laboratorium Farmasetika, Drs. Hayun, M.Si., selaku ketua Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif serta seluruh Bapak dan Ibu dosen Farmasi UI atas segala ilmu dan pendidikan yang telah diberikan selama ini;
5. Ibunda dan ayahanda tercinta atas doa, kasih sayang dan bantuan yang tiada pernah henti; Primagia Anugrah, S.ST sebagai kakak perempuan satu-satunya yang melengkapi perjalanan hidup dari penulis;
6. Bapak/Ibu laboran dan karyawan Farmasi FMIPA UI terutama Mbak Devfanny, Bapak Imih, Bapak Buang, dan Bapak Ma'ruf atas kemurahan hati, dan bantuan yang diberikan;

7. Teman-teman seperjuangan yang selalu memberikan cinta dan semangatnya: Charla, Devin, Selly, Samira, Santi, dan Zhuisa yang sama-sama menempuh masa perkuliahan dengan sifat dan karakter yang saling mengisi;
8. Teman-teman/kakak-kakak mahasiswa penelitian, teman satu bimbingan, juga kak Kurnia Sari, S.Farm, Apt., dan kak raditya Iswandana, S.Farm, Apt., dan tak lupa kepada segenap teman-teman Farmasi 2008 atas kerjasama dan bantuannya selama masa kuliah maupun penelitian;
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan bantuan, semangat, doa dan dukungannya selama penelitian berlangsung.

Akhir kata, penulis berharap dan berdoa agar Allah SWT membalas lebih besar lagi atas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Harapan lain tentu agar skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan kebaikan bagi pembacanya.

Penulis  
2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

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

Nama : Kartika Widyanty  
NPM : 0806453636  
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 Metode Ekstrusi Bertingkat dan Penambahan Asam Palmitat terhadap  
Karakter dan Penjerapan Liposom Spiramisin

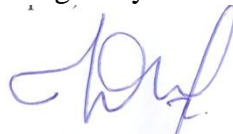
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 5 Juli 2012

Yang menyatakan



( Kartika Widyanty)

viii



## ABSTRAK

Nama : Kartika Widyanty  
Program Studi : Farmasi  
Judul : Pengaruh Metode Ekstrusi bertingkat dan Penambahan Asam Palmitat terhadap Karakteristik dan Penjerapan Liposom Spiramisin

Liposom merupakan sistem penghantaran obat nanopartikel berbasis lipid yang bersifat biokompatibel dengan berbagai obat, peptida, protein, dan plasmid DNA. Dalam menghasilkan liposom yang berukuran 0,1-1  $\mu\text{m}$  diperlukan metode yang tepat sesuai karakteristik yang diinginkan. Metode ekstrusi secara bertingkat akan mengecilkan ukuran partikel liposom dengan hasil yang lebih homogen. Penelitian ini dilakukan untuk membuat dan mengkarakterisasi liposom spiramisin yang ditambahkan asam palmitat dan diperkecil ukurannya dengan ekstrusi bertingkat. Liposom dibuat dengan metode hidrasi lapis tipis dan dilanjutkan dengan ekstrusi bertingkat melalui membran polikarbonat 0,4  $\mu\text{m}$  dan 0,2  $\mu\text{m}$ . Penggunaan asam palmitat pada formulasi liposom diharapkan dapat menambahkan sifat fleksibilitas saat liposom diekstrusi melalui membran berpori. Pada penelitian ini digunakan spiramisin untuk mempelajari kemampuan penjerapan liposom. Berdasarkan evaluasi diperoleh liposom multilamela dengan efisiensi penjerapan yang menurun setelah diekstrusi yaitu  $87,98 \pm 0,73\%$ ,  $48,15 \pm 4,01\%$ , dan  $28,35 \pm 1,18\%$ . Hasil ekstrusi juga menunjukkan ukuran diameter partikel rata-rata yang menurun sebesar 536, 408, dan 403 nm. Hasil analisa termal menunjukkan asam palmitat sedikit meningkatkan sifat rigiditas dari liposom sehingga mampu menaikkan kemampuan penjerapan liposom spiramisin.

Kata kunci : Asam palmitat, efisiensi penjerapan, ekstrusi bertingkat, hidrasi lapis tipis, karakteristik, liposom, spiramisin.

xvi + 81 halaman : 18 gambar, 2 tabel, 40 lampiran

Daftar Pustaka : 37 (1983-2011)

## ABSTRACT

Name : Kartika Widyanty  
Study Program : Farmasi  
Title : The Effect of Sequential Extrusion Method and Addition of Palmitic Acid to Liposome Characteristic and Entrapment of Spiramycin

Liposomes as drug delivery system are lipid-based nanoparticles that are biocompatible with various drugs, peptides, proteins, and plasmic DNA. The appropriate methods are needed in producing liposomes which the size is 0.1 up to 1  $\mu\text{m}$  according to the desired characteristics. The sequential extrusion is a method that is able to shrink the particle size of liposome with a more homogeneous results. The aim of this study is to make and characterize a liposome that entrap spiramycin in addition of palmitic acid which is reduction of particle size with sequential extrusion method. Liposomes were prepared by thin-layer hydration followed by sequential extrusion through a polycarbonate membrane 0.4  $\mu\text{m}$  and 0.2  $\mu\text{m}$ . Palmitic acid in liposome formulations are expected to add flexibility properties as liposomes extruded through a porous membrane. In this study spiramycin used to study the entrapment ability of liposomes. Based on the evaluation, multilamela liposomes was obtained and the entrapment efficiency were  $87.98 \pm 0.73\%$  with decreased after extruded,  $48.15 \pm 4.01\%$ , and  $28.35 \pm 1.18\%$ , respectively. Extrusion also indicate the average of particle size is decreased by 536, 408, and 403 nm. Thermal analysis results showed palmitic acid slightly increases the rigidity properties of the liposomes so that can increase the ability of entrapment.

Keywords : characteristics, entrapment efficiency, liposomes, palmitic acid, sequential extrusion, spiramycin, thin-film hydration.  
xvi + 81 pages : 18 figures, 2 table, 40 appendices  
Bibliography : 37 (1983-2011)

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xv</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	3
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Liposom .....	3
2.2 Pembuatan Liposom .....	12
2.3 Ekstrusi Bertingkat.....	16
2.4 Bahan yang Digunakan.....	16
2.5 Karakterisasi Liposom.....	20
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN</b> .....	<b>22</b>
3.1 Lokasi .....	22
3.2 Alat .....	22
3.3 Bahan .....	22
3.4 Cara Kerja .....	23
<b>BAB 4 PEMBAHASAN</b> .....	<b>31</b>
4.1 Pembuatan Liposom dengan Metode Hidrasi Lapis Tipis.....	31
4.2 Ekstrusi Bertingkat dengan Membran Polikarbonat Berukuran Pori 0,4 $\mu\text{m}$ dan 0,2 $\mu\text{m}$ .....	33
4.3 Pembuatan Spektrum Serapan dan Kurva kalibrasi Spiramisin dalam Larutan Dapar Fosfat pH 7,4.....	34
4.4 Pembuatan Spektrum Serapan dan Kurva kalibrasi Spiramisin dalam Metanol.....	35
4.5 Penentuan Jumlah Spiramisin yang Tertinggal pada Membran Ekstrusi .....	35
4.6 Karakterisasi Liposom.....	36

<b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>45</b>
5.1 Kesimpulan .....	45
5.2 Saran .....	45
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>46</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Skematik struktural dari liposom (liposom multilamela).....	4
Gambar 2.2. Representasi jenis liposom berdasarkan ukuran dan jumlah lapisan .....	6
Gambar 2.3. Pembentukan liposom berdasarkan teori pertunasan .....	8
Gambar 2.4. Pembentukan liposom berdasarkan teori fragmentasi.....	9
Gambar 2.5. Pembuatan liposom dengan metode hidrasi .....	11
Gambar 2.6. Mekanisme pecahnya liposom oleh ultrasonikasi .....	12
Gambar 2.7. Skematik proses ekstrusi liposom melewati membran berpori .....	13
Gambar 2.8. Struktur kimia fosfatidilkolin .....	14
Gambar 2.9. Struktur kimia kolesterol .....	15
Gambar 2.10. Struktur kimia asam palmitat .....	16
Gambar 2.11. Struktur kimia spiramisin .....	17
Gambar 4.1. Mikrograf <i>Scanning Electron Microscope</i> dua formula liposom dengan perbesaran 4000x .....	36
Gambar 4.2. Mikrograf <i>Transmission Electron Microscope</i> liposom formula 1 .....	37
Gambar 4.3. Mikrograf <i>Transmission Electron Microscope</i> liposom formula 2.....	38
Gambar 4.4. Hasil efisiensi penjerapan dua formula liposom.....	39
Gambar 4.5. Penurunan ukuran partikel liposom sebelum dan sesudah ekstrusi.....	40
Gambar 4.6. Contoh termogram kolesterol dengan DSC.....	41
Gambar 4.7. Termogram <i>overlay</i> hasil analisis dengan DSC .....	42

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1. Formulasi 50 ml suspensi liposom spiramisin .....	22
Tabel 4.1. Data hasil pengukuran analisis sifat termal .....	43



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Lapis tipis yang terbentuk dalam labu bulat .....	49
Lampiran 2.	Hasil hidrasi lapis tipis dalam labu bulat .....	49
Lampiran 3.	Spektrum serapan spiramisin dalam dapar fosfat pH 7,4.....	50
Lampiran 4.	Kurva Kalibrasi spiramisin dalam dapar fosfat pH 7,4.....	50
Lampiran 5.	Spektrum serapan spiramisin dalam metanol.....	51
Lampiran 6.	Kurva Kalibrasi spiramisin dalam metanol.....	51
Lampiran 7.	Grafik persentase dialisis spiramisin dalam formula 1 .....	52
Lampiran 8.	Grafik persentase dialisis spiramisin dalam formula 2 .....	52
Lampiran 9.	Suspensi yang dihasilkan dari formula 1 dan 2.....	53
Lampiran 10.	Bentuk dan morfologi liposom F1 dan F2 tanpa ekstrusi dengan Scanning Electron Microscope (SEM) perbesaran 6000x .....	53
Lampiran 11.	Pengamatan warna liposom sebelum dan sesudah ekstrusi .....	53
Lampiran 12.	Hasil pengukuran <i>Particle Size Analyzer</i> F1.....	54
Lampiran 13.	Hasil pengukuran <i>Particle Size Analyzer</i> F2.....	55
Lampiran 14.	Termogram fosfatidilkolin/lesitin dengan DSC .....	56
Lampiran 15.	Termogram kolesterol dengan DSC.....	57
Lampiran 16.	Termogram asam palmitat dengan DSC .....	58
Lampiran 17.	Termogram liposom formula 1 dengan DSC .....	59
Lampiran 18.	Termogram liposom formula 2 dengan DSC .....	60
Lampiran 19.	Data konsentrasi dan serapan kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 7,4.....	61
Lampiran 20.	Data konsentrasi dan serapan kurva kalibrasi spiramisin dalam metanol.....	61
Lampiran 21.	Data hasil dialisis formula 1 sebelum ekstrusi (percobaan1).....	62
Lampiran 22.	Data hasil dialisis formula 1 sebelum ekstrusi (percobaan 2).....	63
Lampiran 23.	Data hasil dialisis formula 1 ekstrusi 0,4 $\mu\text{m}$ (percobaan 1).....	64
Lampiran 24.	Data hasil dialisis formula 1 ekstrusi 0,4 $\mu\text{m}$ (percobaan 2).....	65
Lampiran 25.	Data hasil dialisis formula 1 ekstrusi 0,2 $\mu\text{m}$ (percobaan 1).....	66
Lampiran 26.	Data hasil dialisis formula 1 ekstrusi 0,2 $\mu\text{m}$ (percobaan 2).....	67
Lampiran 27.	Data hasil dialisis formula 2 sebelum ekstrusi (percobaan1).....	68
Lampiran 28.	Data hasil dialisis formula 2 sebelum ekstrusi (percobaan 2).....	69
Lampiran 29.	Data hasil dialisis formula 2 ekstrusi 0,4 $\mu\text{m}$ (percobaan 1).....	70
Lampiran 30.	Data hasil dialisis formula 2 ekstrusi 0,4 $\mu\text{m}$ (percobaan 2).....	71
Lampiran 31.	Data hasil dialisis formula 2 ekstrusi 0,2 $\mu\text{m}$ (percobaan 1).....	72
Lampiran 32.	Data hasil dialisis formula 2 ekstrusi 0,2 $\mu\text{m}$ (percobaan 2).....	73
Lampiran 33.	Skema pembuatan liposom dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis .....	74
Lampiran 34.	Skematik dan petunjuk pemasangan alat <i>Mini Extruder</i> .....	75
Lampiran 35.	Contoh perhitungan efisiensi penjerapan spiramisin oleh liposom dengan metode dialisis .....	76
Lampiran 36.	Contoh perhitungan jumlah spiramisin yang tertahan pada membran ekstrusi .....	77
Lampiran 37.	Sertifikat analisis lesitin .....	78

Lampiran 38. Sertifikat analisis kolesterol .....	79
Lampiran 39. Sertifikat analisis asam palmitat .....	80
Lampiran 40. Sertifikat analisis spiramisin .....	81





# BAB 1 PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Sistem penghantaran obat dikenal dapat meningkatkan waktu sirkulasi obat, mengurangi toksisitas, serta peningkatan efikasi. Sistem ini juga menghantarkan substansi terapi ke lokasi aktifnya di dalam tubuh sehingga meningkatkan keamanan dari obat (Jain, 2008). Liposom merupakan sistem penghantaran obat nanopartikel berbasis lipid yang telah berkembang dan bersifat biokompatibel dengan berbagai obat, peptida, protein, serta plasmid DNA. Liposom dengan ukuran 0,1–1  $\mu\text{m}$  telah banyak dihasilkan sesuai dengan tujuan terapinya. Oleh karena itu diperlukan metode yang tepat dalam menghasilkan liposom dengan karakteristik yang diinginkan.

Pembuatan liposom umumnya akan menghasilkan liposom dengan ukuran yang tidak seragam. Metode selanjutnya yang digunakan untuk memperkecil ukuran partikel liposom adalah sonikasi (Connor, Yatvin dan Huang, 1983) dan ekstrusi (Lokling, Fossheim, Bjornerud, dan Klaveness, 2001; Sudimack, Guo, Tjarks, dan Lee, 2002; Lokling, Skurtveit, Fossheim, Smistad, Henriksen, dan Klaveness, 2003; Phoeung, Aubron, Rydzek, dan Lafleur, 2010). Sonikasi dapat mengganggu vesikel liposom multilamela sehingga menghasilkan vesikel kecil satu lamela (*Small Unilamellar Vesicles/SUV*) tetapi juga membawa potensi terjadinya agregasi dan fusi dari liposom (Ulrich, 2002). Vesikel multilamela yang diekstrusi beberapa kali melalui membran polikarbonat dan suatu tekanan akan secara nyata menjadi lebih kecil (Martin, 1990). Ekstrusi bertingkat dapat mengecilkan ukuran liposom dengan cara melewati liposom berulang kali pada beberapa ukuran membran berpori dengan ukuran yang semakin mengecil. Ekstrusi dilakukan bertingkat agar diperoleh liposom yang lebih homogen dan membentuk kembali liposom yang pecah saat proses ekstrusi berlangsung. Oleh karena itu, dipilih metode ekstrusi bertingkat untuk memperkecil ukuran serta menghasilkan liposom yang homogen dalam hal distribusi ukuran.

Telah dilakukan penelitian terhadap liposom yang mengandung antibiotik golongan makrolida seperti azitromisin dan klaritromisin terhadap bakteri patogen intrasel (Drulis-Kawa dan Dorotkiewicz-Jach, 2009). Oleh karena itu, dalam

penelitian ini digunakan juga obat antibiotik makrolida untuk mempelajari kemampuan penjerapan liposom terhadap senyawa yang mirip dengan antibiotik tersebut. Spiramisin dipilih sebagai zat aktif selain penggunaannya sebagai obat alternatif pada pasien toksoplasmosis (Setiabudy, 2007).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Ramadhani (2011), telah diteliti kemampuan penjerapan liposom spiramisin menggunakan asam oleat serta sensitivitasnya terhadap pH. Penambahan asam oleat pada liposom spiramisin tersebut juga diketahui dapat meningkatkan fleksibilitas dan deformabilitas liposom, namun di sisi lain dapat mengurangi kemampuan penjerapan liposom terhadap spiramisin itu sendiri (Saputra, 2011). Selain menggunakan asam oleat, formulasi liposom spiramisin juga dapat menggunakan asam palmitat (Lokling, Skurtveit, Fosshem, Smistad, Henriksen, dan Klaveness, 2003).

Pada penelitian ini, dilakukan pembuatan liposom dengan cara hidrasi lapis tipis dan dilanjutkan dengan ekstrusi bertingkat melalui membran polikarbonat berukuran pori 0,4  $\mu\text{m}$  dan 0,2  $\mu\text{m}$  untuk mengecilkan ukuran liposom. Asam palmitat yang digunakan dalam penelitian ini diharapkan dapat memberikan sifat fleksibilitas liposom dan meningkatkan kemampuan penjerapan liposom.

## **1.2 Tujuan Penelitian**

1. Membuat liposom spiramisin dengan penambahan asam palmitat menggunakan metode ekstrusi bertingkat.
2. Mengkarakterisasi liposom spiramisin yang telah dibuat.
3. Melakukan evaluasi nilai efisiensi penjerapan liposom spiramisin yang ditambahkan asam palmitat.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Liposom**

##### 2.1.1 Definisi liposom

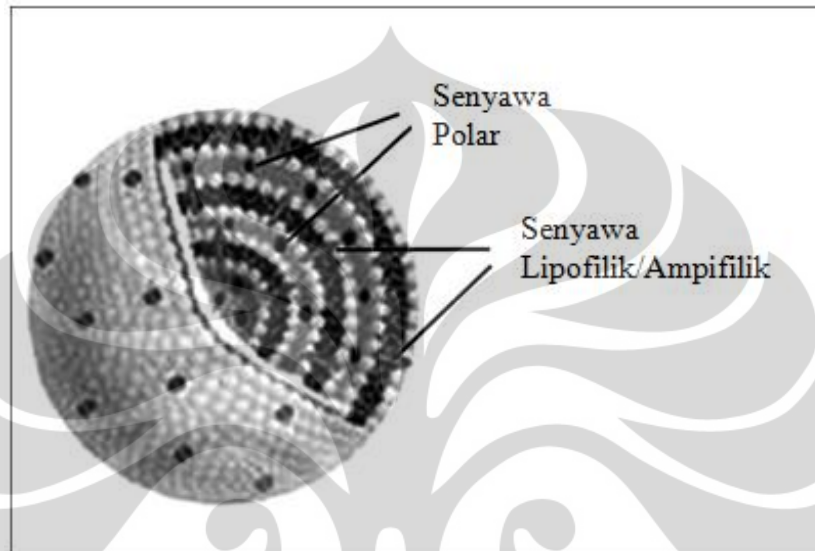
Liposom merupakan suatu vesikel yang terdiri dari fosfolipid satu lapis atau multilapis. Liposom dapat dikatakan memiliki bentuk yang sferis dan terdiri dari lipid bilayer yang bergantian dengan fase cairnya (Swarbrick, 2007). Berikut ini beberapa definisi dari liposom:

- a. Liposom adalah kantung lipid yang tertutup dan dalam rentang mikron dan sub-mikron (0,1-1  $\mu\text{m}$ ) terdispersi dalam suatu lingkungan yang berair (Barenholz dan Crommelin, 1994).
- b. Liposom adalah membran fosfolipid bilayer dengan volume cairan yang terjepit di dalamnya (Wu, Zhao, dan 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, dan Khar, 2006).

Beberapa kelebihan karakteristik farmasetik dan farmakologi dari liposom adalah (Barenholz dan 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 diantaranya yaitu secara okular, pulmonari, nasal, oral, intramuskular, subkutan, topikal, dan intravena.
- h. Farmakokinetik dan biodistribusi liposom secara *in vivo* dapat diatur oleh komposisi lipid dan ukuran liposom.



[Sumber : Pignatello, Musumeci, Carbone, dan Puglisi, 2011]

**Gambar 2.1.** Skematik struktural dari liposom (liposom multilamela) (telah diolah kembali)

### 2.1.2 Bahan Pembentuk Liposom

Bahan yang digunakan sebagai penyusun liposom, yaitu fosfolipid atau lipoprotein yang merupakan bahan alami sehingga biokompatibel di dalam tubuh. Lipid penyusun liposom dapat berupa fosfolipid serta lipid dari golongan sterol seperti kolesterol. Fosfolipid, sebagai bahan utama penyusun liposom diklasifikasikan menjadi empat kelompok berdasarkan bahan penyusunnya (Barenholz dan Crommelin, 1994):

#### 2.1.2.1 Fosfolipid Alam

Fosfolipid alam didapat dari telur atau kedelai. Contoh dari fosfolipid alam adalah fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, sfingomielin dan fosfatidilinositol. Fosfolipid yang berasal dari telur (fosfolipid hewan) memiliki

rantai asil jenuh pada posisi satu dan rantai asil tidak jenuh pada posisi dua. Fosfolipid tumbuhan memiliki rantai asil tidak jenuh pada posisi satu dan dua, 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. Contoh senyawa ini adalah dioleilfosfatidilkolin (DOPC) atau dioleil-fosfatidiletanolamin (DOPE).

#### 2.1.3 Klasifikasi Liposom

##### 2.1.3.1 Berdasarkan jumlah lapisan (lamela) dan diameter liposom.

Berdasarkan jumlah lapisan dan ukuran (diameter), liposom dapat dikelompokkan menjadi tiga jenis utama, yaitu *Multilamellar Vesicles*, *Large Unilamellar Vesicles*, dan *Small Unilamellar Vesicles* (Biju, Talegaonkar, Mishra, dan Khar, 2006).

##### a. *Multilamellar Vesicles* (MLV)

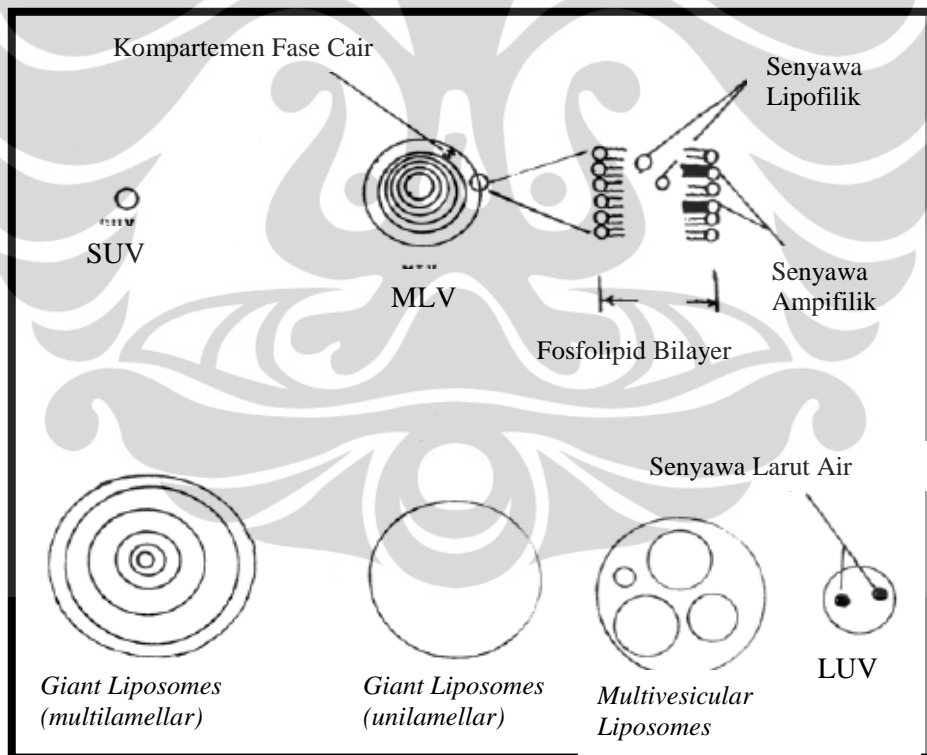
*Multilamellar vesicles* memiliki rentang ukuran antara 0,1 - 0,3  $\mu\text{m}$  dengan lapisan *bilayer* lebih dari satu. Secara mekanik *Multilamellar Vesicles* lebih stabil terhadap penyimpanan dalam jangka waktu yang cukup lama; secara cepat akan ditangkap oleh sistem retikuloendoplasma dalam tubuh; mudah untuk dibuat dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis lipid dengan adanya pelarut organik.

b. *Large Unilamellar Vesicles (LUV)*

*Large Unilamellar Vesicles* memiliki rentang ukuran antara 0,1 – 10  $\mu\text{m}$  dengan hanya satu lapisan bilayer. *Large Unilamellar Vesicles* lebih ditujukan untuk sistem penghantaran obat hidrofilik dan dapat menjerap makromolekul dengan baik. Di dalam tubuh *Large Unilamellar Vesicles* akan dengan cepat diambil oleh sistem retikulum endoplasma. *Large Unilamellar Vesicles* dapat dibuat dengan metode dialisis, injeksi eter, maupun penguapan fase-balik.

c. *Small Unilamellar Vesicles (SUV)*

*Small Unilamellar Vesicles* memiliki rentang ukuran lebih kecil dari 0,1  $\mu\text{m}$  dengan hanya satu lapisan bilayer serta lebih homogen dalam ukuran. SUV secara termodinamik tidak stabil, sehingga cenderung untuk bergabung dan menggumpal satu sama lain. SUV dapat dibuat dengan mereduksi ukuran MLV dan LUV menggunakan ultrasonifikasi atau teknologi ekstrusi.



[Sumber: Riaz, 1996]

Keterangan: *MLV* = *Multilamellar Vesicles*,  
*LUV* = *Large Unilamellar Vesicles*,  
*SUV* = *Small Unilamellar Vesicles*.

**Gambar 2.2.** Representasi jenis liposom berdasarkan ukuran dan jumlah lapisan (telah diolah kembali)

Universitas Indonesia

2.1.3.2 Berdasarkan bahan penyusun dan model penghantaran obat. (Biju, Talegaonkar, Mishra, dan Khar, 2006)

Berdasarkan bahan penyusun dan model penghantaran obatnya, liposom diklasifikasikan dalam tujuh jenis yaitu:

a. 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.

b. Liposom Sensitif pH

Liposom jenis ini terutama 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 melepaskan kandungan zat aktifnya pada kondisi pH yang rendah di sitoplasma. Liposom jenis ini dapat digunakan sebagai pembawa obat makromolekular dan yang bersifat basa lemah.

c. 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.

d. Liposom Sirkulasi Panjang (*Stealth Liposome*)

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

e. 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.

f. Liposom Magnetik

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

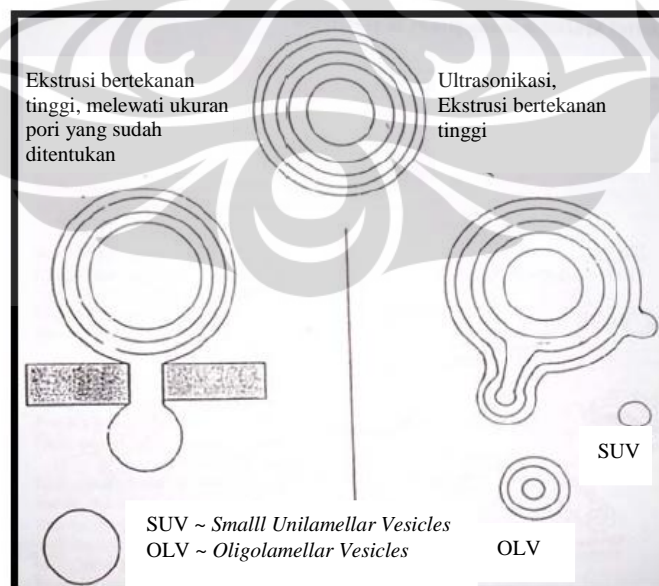
g. Liposom Sensitif Suhu

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.

#### 2.1.4 Mekanisme Pembentukan Liposom

Mekanisme pasti dari pembentukan liposom belum diketahui seluruhnya. Pembentukan dapat dijelaskan dengan dua teori yaitu teori pertunasan dan teori fragmen fosfolipid lapis ganda (Lasic, 1995; Barenholz dan Crommelin, 1994).

##### 2.1.4.1 Teori pertunasan (*Budding off*)



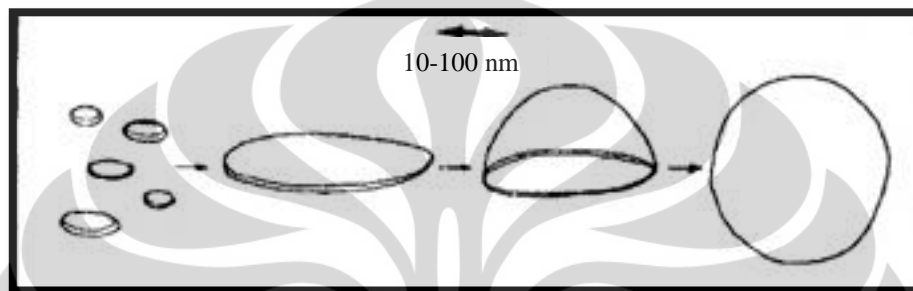
[Sumber: Barenholz dan Crommelin, 1994]

**Gambar 2.3.** Pembentukan liposom berdasarkan teori pertunasan (telah diolah kembali)



Teori pertunasan 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.

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



[sumber: Lasic, 1995]

**Gambar 2.4.** Pembentukan liposom berdasarkan teori fragmentasi (telah diolah kembali)

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

#### 2.1.5 Mekanisme Penjerapan Obat oleh Liposom

Mekanisme obat-obat ataupun ligan dapat terperat di dalam liposom bergantung pada sifat sifat fisikokimianya, yaitu enkapsulasi (untuk senyawa-senyawa hidrofilik), solubilisasi pada fase lipid (untuk senyawa-senyawa lipofilik), konjugasi dengan rantai lipid (untuk *prodrug* yang merupakan lipid derivatisasi), kompleksasi elektrostatik untuk molekul-molekul polianionik seperti asam nukleat (Wu, Zhao, dan Lee, 2007).

## 2.2 Pembuatan Liposom

Sifat dan penampilan liposom sangat tergantung dari komposisi dan metode pembuatannya. Metode pembuatan dan pemilihan bahan pembentuk liposom bergantung pada berbagai hal (Barenholz dan Crommelin, 1994) , diantaranya:

- a. Sifat-sifat liposom yang ingin dibentuk, berdasarkan aspek farmakokinetik, rute pemberian, kecepatan disintegrasi, serta pertimbangan pembentukan liposom *long-circulating*.
- b. Karakteristik fisikokimia dari obat yang akan dijerap
- c. Waktu simpan liposom (*shelf life*)
- d. Aspek avabilitas, ekonomis, farmasetis, dan keamanan dari bahan pembuatan liposom.

Proses pencampuran obat ke dalam bahan-bahan pembentuk liposom dan penyerapan obat bergantung pada lipofilisitas obat. Obat-obat yang bersifat lipofilik dilarutkan ke dalam fase lipid saat pembuatan liposom, sedangkan obat-obat hidrofilik dapat terenkapsulasi secara pasif pada saat liposom terbentuk (Wu, Zhao, dan Lee, 2007).

Secara umum, pembuatan liposom dilakukan dengan melarutkan lipid dengan pelarut yang sesuai, yaitu pelarut organik yang mudah menguap ataupun campuran pelarut (seperti kloroform, eter, etanol, atau kombinasinya), diikuti dengan penghilangan pelarut, hidrasi lipid dan reduksi atau pengecilan ukuran partikel. Pelarut dihilangkan dengan menggunakan *rotary evaporator* yang kemudian akan membentuk lapisan tipis. Proses hidrasi lipid dilakukan dengan mencampurkan fase air ke lapisan tipis tersebut dengan menggunakan suhu di atas fase transisi dari fosfolipid dimana terjadi perubahan dari fase gel ke fase cairan. Reduksi ukuran partikel dapat dilakukan dengan metode sonikasi, ekstrusi, homogenisasi atau homogenisasi tekanan tinggi. Selain reduksi ukuran partikel, juga dapat dilakukan reduksi jumlah lapisan yaitu dengan metode *freeze and thaw* (Biju, Talegaonkar, Mishra, dan Khar, 2006; Martin, 1990).

Berdasarkan proses penting pembuatan liposom, secara umum metode pembuatan liposom dibagi menjadi dua, hidrasi dan pengaturan ukuran (Barenholz dan Crommelin, 1994):

## 2.2.1 Hidrasi

### 2.2.1.1 Hidrasi lapis tipis

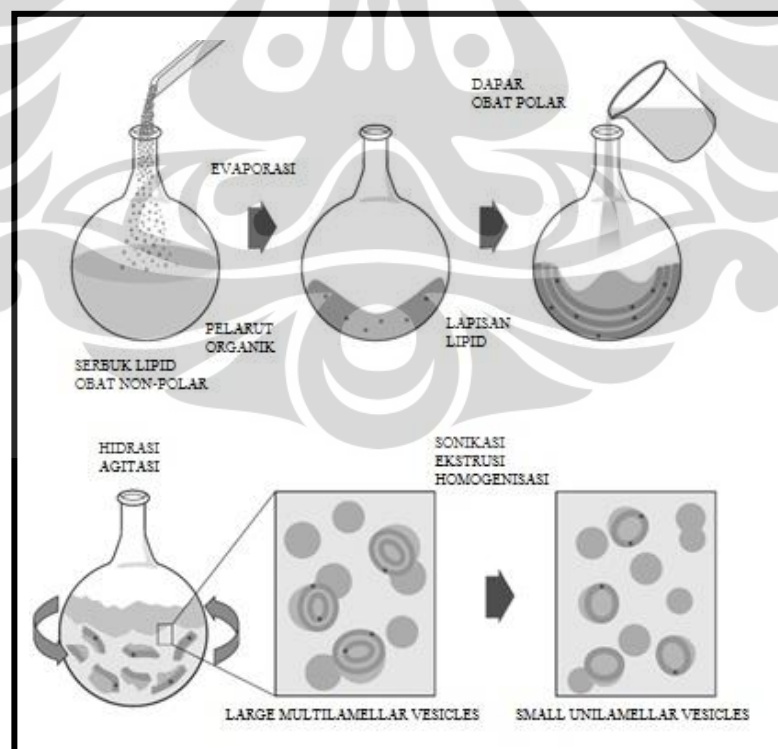
Hidrasi lapis tipis dilakukan dengan proses pengocokkan mekanik. Lipid dilarutkan dalam pelarut organik, kemudian pelarut diuapkan dengan alat *rotary evaporation* dengan bantuan vakum, dan vesikel yang terbentuk akan terdeposit di dasar wadah. Produk yang dihasilkan berupa MLV (*Multilamellar Large Vesicles*) berukuran sekitar 10  $\mu\text{m}$  (Martin, 1990).

### 2.2.1.2 Penggantian dengan pelarut organik

Ada dua macam pelarut organik yang dapat digunakan yaitu pelarut organik yang dapat bercampur air seperti etanol, metanol, dan isopropilalkohol; dan tidak bercampur air seperti eter. Produk yang dihasilkan adalah MLV, OLV (*Oligolamellar Vesicles*), dan UV (*Unilamellar Vesicles*).

### 2.2.1.3 Pencampuran dengan surfaktan.

Proses pencampuran antara surfaktan dengan lipid menghasilkan misel, diikuti dengan penguapan pelarut, dan menghasilkan produk OLV, UV, dan SUV.



[sumber: Lasic, 1997]

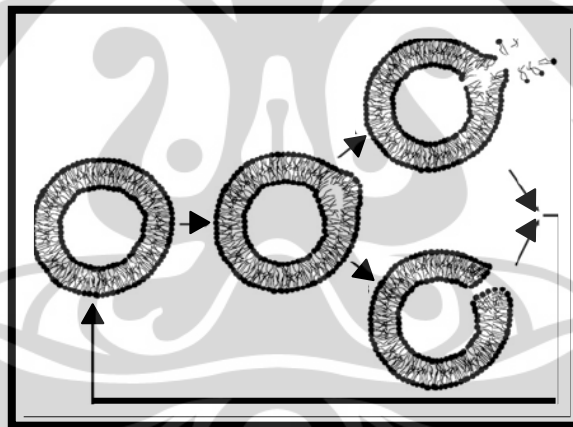
**Gambar 2.5.** Pembuatan lipid dengan metode hidrasi (telah diolah kembali)

### 2.2.2 Pengaturan Ukuran

Dalam pembuatan liposom, hidrasi merupakan metode yang paling sering digunakan. Metode hidrasi dari lapisan kering lipid akan membentuk suatu liposom awal berupa vesikel multilamellar (MLV/*Multilamellar vesicles*). Untuk menghasilkan liposom jenis LUV atau SUV, liposom selanjutnya ditujukan untuk pengecilan ukuran diameter dengan dua cara, sonikasi dan ekstrusi (Palankar, Ramaye, Fournier, dan Winterhalter, 2008).

#### 2.2.2.1 Ultrasonikasi

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



[Sumber: Shroeder, Kost, dan Barenholz, 2009]

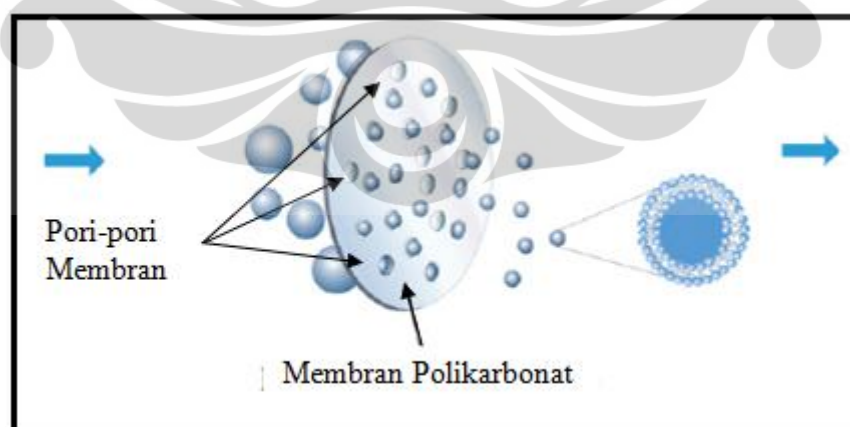
**Gambar 2.6.** Mekanisme pecahnya liposom oleh ultrasonikasi (telah diolah kembali)

#### 2.2.2.2 Ekstrusi

Metode pengecilan ukuran partikel yang umum seperti sonikasi dapat menghasilkan liposom SUV yang tidak hanya memiliki kemampuan penyerapan yang kecil sehingga terbatas dalam penggunaan, tetapi juga membuat vesikel tidak stabil secara fisik karena rentan terjadi agregasi. Proses ekstrusi pada skala

industri menggunakan alat besar dan menggunakan gas nitrogen untuk menghasilkan suatu tekanan sekitar 100-800 lb/in<sup>2</sup> (dengan 1 lb/in<sup>2</sup> = 6895 Pa), untuk mendorong liposom agar dapat melewati suatu filter dengan bahan polikarbonat. Membran filter berpori yang terbuat dari polikarbonat digunakan karena bersifat *inert*, tahan lama, dan mudah untuk diaplikasikan untuk mengekstrusi tanpa terjadi kerusakan. Alat ekstrusi lain yang digunakan di pasaran adalah alat yang terdiri dari *syringe* dan *holder* yang menjalankan proses ekstrusi dari lipid diatas suhu transisinya, sehingga ekstrusi terjadi pada fase transisi lipid.

Ekstrusi menyebabkan lapisan bilayer liposom mendapat tegangan geser, sehingga vesikel pecah dan menjadi lebih kecil. Skematik proses ekstrusi dapat dilihat pada Gambar 2.7. Ekstrusi dilakukan bertahap melewati filter dengan ukuran pori yang semakin menurun. Jika preparasi liposom melewati pori dilewatkan secara berulang kali (lebih dari satu siklus), maka proses ini akan meningkatkan populasi liposom dengan diameter rata-rata yang serupa dengan pori dari filter dan distribusi ukuran yang lebih homogen. Semakin besar siklus ekstrusi maka akan menghasilkan vesikel dengan ukuran yang sesuai mendekati ukuran pori dan populasinya akan meningkat (semakin homogen). Siklus ekstrusi yang dilakukan hingga 10 kali dapat diamati bahwa hanya sedikit perubahan yang terjadi pada diameter vesikel setelah siklus dilakukan sebanyak 5 kali, sehingga ekstrusi dapat dilakukan minimal sebanyak 5 siklus (Mui dan Hope, 2007).



[Sumber: Se, *et al.*, 2009]

**Gambar 2.7.** Skematik proses ekstrusi liposom melewati membran berpori (telah diolah kembali)

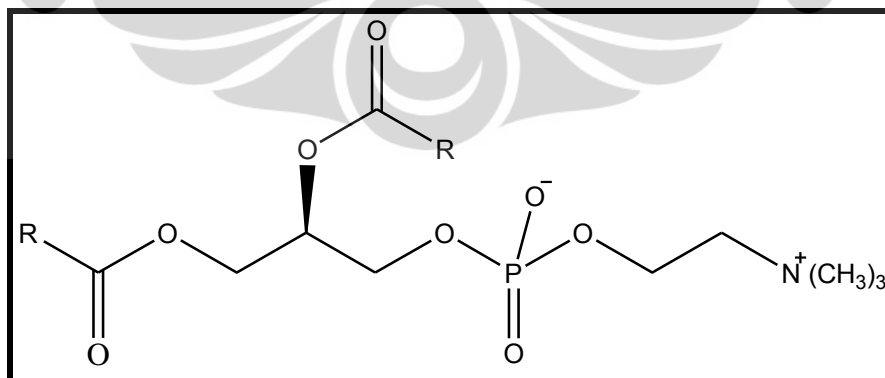
### 2.3 Ekstrusi Bertingkat

Pembentukan MLV dari proses hidrasi yang dilanjutkan dengan proses sonikasi yang intensif akan menghasilkan liposom SUV dengan rentang diameter 30-100 nm. Liposom jenis LUV dengan rentang ukuran diameter 100 nm – 1  $\mu$ m merupakan partikel yang lebih diminati dalam dunia farmasi sebagai penghantaran obat, diagnosis, teknologi pangan, dan reaktor biokimia dalam ukuran sub-mikron. Untuk beberapa komposisi lipid, LUV dapat dihasilkan dengan cara ekstrusi.

Ekstrusi bertingkat adalah cara pengecilan ukuran dengan melewati liposom dengan beberapa ukuran pori membran yang semakin mengecil. Ekstrusi bertingkat juga menggunakan sejumlah siklus setiap melewati satu ukuran pori. Distribusi ukuran yang homogen dicapai setelah melewati sepuluh kali membran (Palankar, Ramaye, Fournier, dan Winterhalter, 2008). Dalam pembuatan beberapa liposom LUV, ekstrusi bertingkat melewati membran ukuran pori tertentu juga dilakukan dengan jumlah siklus yang berbeda-beda untuk menghasilkan liposom dengan populasi yang seragam. Ekstrusi bertingkat dapat dilakukan sebanyak lima kali (Berger, Sachse, Bender, Schubert, dan Brandl, 2001), sembilan kali (Garcia-Jimeno, Escribano, Queralt, dan Estelrich, 2011), dan sepuluh kali (Lee, Barnett, dan Reaven, 1998; Thomas M., *et al.*, 2011).

### 2.4 Bahan-Bahan yang Digunakan

#### 2.4.1 Fosfatidilkolin (Lesitin/Egg Yolk Phosphatidylcholine)



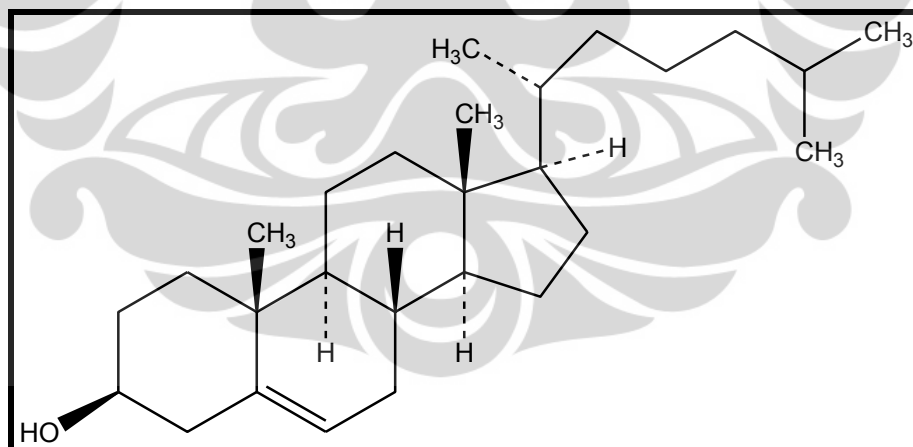
[Sumber: O'neil, *et al.*, 2001]

Keterangan : R adalah rantai asam lemak yang dapat berbeda atau sama

**Gambar 2.8.** Struktur kimia fosfatidilkolin (telah diolah kembali)

Fosfatidilkolin dengan nama trivial lesitin, merupakan fosfolipid yang paling banyak terdapat di hewan (telur) dan tumbuhan (kedelai). Fosfatidilkolin ditemukan di semua makhluk hidup, baik hewan dan tumbuhan, serta sebagai penyusun utama jaringan saraf dan otak. Campuran digliserida berupa asam stearat, palmitat dan oleat serta terikat pada ester kolin dari asam fosfat. Fosfatidilkolin merupakan molekul utama penyusun membran lipid bilayer, sehingga fosfatidilkolin dapat digunakan sebagai bahan penyusun liposom dan dapat bersifat *biodegradable*. Pemerian fosfatidilkolin berupa masa yang lengket (*waxy mass*), berwarna putih saat pertama kali dibuat kemudian segera berwarna kuning kecoklatan ketika telah berkontak dengan udara, Fosfatidilkolin tidak larut dalam air tapi larut baik dalam kloroform. Fosfatidilkolin merupakan surfaktan yang dapat dimakan dan dicerna baik oleh tubuh, digunakan dalam industri makanan, farmasetik serta kosmetik (O'neil, 2001). Fosfatidilkolin memiliki bobot molekul sebesar 770,123 g/mol dan memiliki temperatur transisi ( $T_m$ ) pada suhu sekitar 55°C (Rowe, Sheskey, dan Quinn, 2009).

#### 2.4.2 Kolesterol



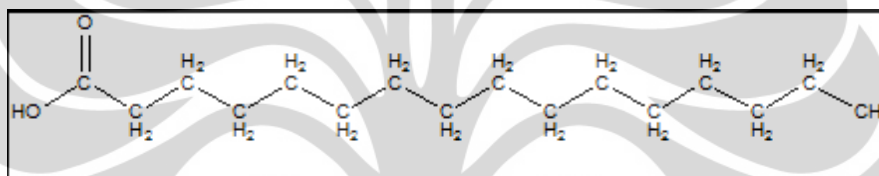
[Sumber: O'neil, *et al.*, 2001]

**Gambar 2.9.** Struktur kimia kolesterol (telah diolah kembali)

Kolesterol ditemukan pada semua minyak atau lemak hewan serta merupakan komponen utama empedu. Kolesterol adalah steroid alkohol yang praktis tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik, seperti kloroform

(1 : 4,5) atau etanol (1 : 78). Kolesterol terutama terdapat dalam membran sel, lipoprotein plasma, dan empedu, dimana senyawa ini dapat berasosiasi dengan lipid lain seperti fosfolipid dan asam empedu. Kolesterol memiliki pemerian berupa serbuk atau granul berwarna putih dan bobot molekul 386,65. Titik leleh kolesterol adalah 148,5°C. Dalam formulasi farmasetik, kolesterol biasa digunakan sebagai agen pengemulsi. (O'neil, 2001). Dalam pembuatan liposom, kolesterol berguna meningkatkan rigiditas membran liposom dan meningkatkan pemisahan gugus kolin dibagian kepala membran liposom (Karki, Subramanya, dan Udupa, 2009).

#### 2.4.3 Asam palmitat



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

**Gambar 2.10.** Struktur kimia asam palmitat (telah diolah kembali)

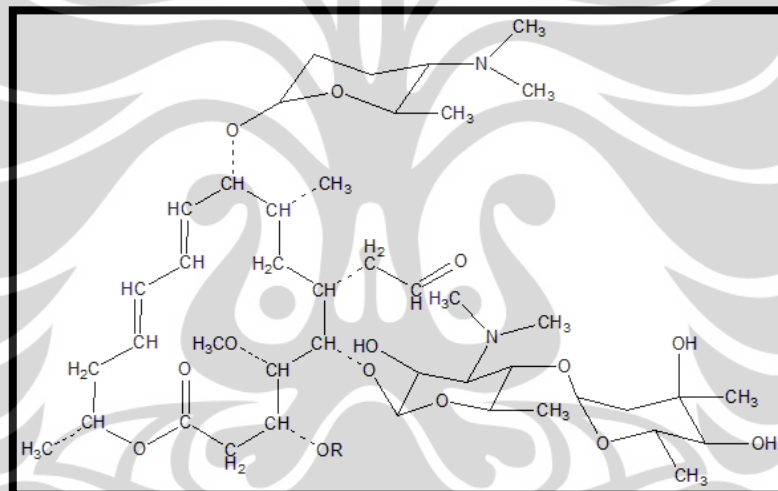
Asam palmitat atau asam heksadekanoat merupakan asam lemak dengan rumus molekul  $C_{16}H_{32}O_2$  dan bobot molekul 256,42. Asam palmitat memiliki pemerian kristal putih dengan sedikit bau yang khas dan memiliki titik leleh pada suhu 63-64°C. Asam palmitat praktis tidak larut dalam air tapi larut dalam pelarut organic (O'neil, 2001). Asam palmitat dapat digunakan dalam formulasi sediaan oral dan topikal. (Rowe, Sheskey, dan Quinn, 2009). Penggunaan asam palmitat pada pembuatan liposom dapat sebagai penstabil lapisan fosfolipid pada liposom di dalam sirkulasi darah.

#### 2.4.4 Spiramisin

Spiramisin adalah antibiotik golongan makrolida yang memiliki cincin lakton diproduksi oleh bakteri strain *Streptomyces ambofaciens*. Spiramisin bersifat basa lemah dan sangat sedikit larut air. Spiramisin memiliki bobot molekul 843.05 g/mol, dan memiliki bentuk serbuk amorf berwarna putih.



Spiramisin larut dalam air dalam perbandingan 1:50 dan sangat larut dalam kloroform. Spiramisin dalam etanol memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 231 nm (O'neil, 2001). Obat ini efektif terhadap kuman stafilokokus, streptokokus, pneumonokokus enterokokus, 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. Spiramisin digunakan sebagai pengobatan alternatif toksoplasmosis bagi pasien yang tidak dapat diobati dengan pirimetamin dan sulfonamid, contohnya ibu hamil. Selain terapi, spiramisin juga digunakan sebagai pencegahan transmisi transplasental dari ibu ke anak (Setiabudy, 2007).



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

Keterangan: Spiramisin I, ( $C_{43}H_{74}N_2O_{14}$ , BM = 843,05) : R = H

Spiramisin II, ( $C_{45}H_{76}N_2O_{15}$ , BM = 885,09) : R = COCH<sub>3</sub>

Spiramisin III, ( $C_{46}H_{78}N_2O_{15}$ , BM = 899,11) : R = COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

**Gambar 2.11.** Struktur kimia antibiotik makrolida spiramisin  
(telah diolah kembali)

Spiramisin umumnya diberikan per oral. Dosis oral untuk pasien dewasa ialah 3-4 kali 500 mg sehari. Sedangkan dosis oral untuk anak ialah 50-75 mg/kgBB sehari, terbagi dalam 2-3 kali pemberian. (Setiabudy, 2007). Studi farmakokinetik menunjukkan bioavailabilitas dari spiramisin yang diberikan secara per oral adalah 36 %. (Frydman, Le, Desnottes, 1988).

## 2.5 Karakterisasi Liposom

### 2.5.1 Bentuk dan morfologi

Bentuk dan morfologi liposom secara mikroskopik dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron SEM dan TEM. SEM atau *scanning electron microscope* bekerja dengan cara memancarkan sinar elektron yang diproduksi di bagian atas mikroskop oleh suatu electron gun. Berkas elektron ini mengikuti jalur vertikal melalui mikroskop, yang diadakan dalam ruang hampa. Berkas sinar berjalan melalui medan elektromagnetik dan lensa magnetik memfokuskan sinar ke bawah (ke arah sampel). Setelah seberkas sinar mengenai sampel, sejumlah elektron dan sinar-X dikeluarkan oleh sampel. Detektor akan mengumpulkan elektron dan sinar-X, serta mengubahnya menjadi sinyal yang dikirim ke monitor untuk menghasikan gambar akhir. Oleh karena SEM memanfaatkan kondisi vakum dan menggunakan elektron untuk membentuk sebuah gambar, maka semua air harus dihilangkan dari sampel karena air akan menguap dalam vakum. Sifat konduktivitas juga diperlukan sehingga semua bahan non-konduktif (bahan non-logam) perlu dibuat konduktif dengan menutup sampel dengan lapisan tipis bahan konduktif. Konduktivitas sampel dibuat dengan melapisi sampel dengan emas menggunakan alat yang *sputter coater* dimana atom-atom emas akan jatuh dan mengenai permukaan sampel membentuk lapisan tipis (Schweitzer, 2010)

TEM atau *transmission electron microscope* menghasilkan gambar dengan resolusi pencitraan lebih tinggi. Sampel yang digunakan untuk TEM harus sangat tipis untuk membuat spesimen yang transparan terhadap berkas elektron yang akan ditransmisikan. TEM yang umum menggunakan tegangan 100-200 kV, sedangkan tegangan yang lebih tinggi akan menghasilkan gambar yang lebih baik (500 kV-3 MV). Elektron diemisikan dari *electron gun* dan berinteraksi dengan kuat terhadap atom dan oleh karena itu harus berupa sampel yang tipis teknik preparasi ini menggunakan *electropolishing* dan *ion-beam*. (Reimer dan Kohl, 2008).

### 2.5.2 Efisiensi penjerapan

Liposom yang terlihat dibawah mikroskop haruslah mengandung obat atau agen biologis yang terjerap pada lapisan bilayer atau terenkapsulasi pada fase cair. Efisiensi penjerapan liposom dapat dilakukan dengan metode dialisis

dengan menghitung jumlah obat terdialisis sebagai jumlah obat yang tidak terjerap. Penetapan kadar spiramisin yang terdialisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dan absorbansi dihitung sebagai konsentrasi dalam ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Harmita, 2006).

### 2.5.3 Distribusi dan ukuran partikel

Penentuan distribusi ukuran partikel liposom dilakukan dengan menggunakan teknik *Light Scattering* yaitu *Dinamic Light Scattering (DLS)* dengan alat yang dinamakan *Particle Size Analyzer (PSA)*. Alat yang digunakan dapat mengukur ukuran partikel sub-mikron, dalam rentang 0,15 nm hingga 10  $\mu\text{m}$ . Prinsip kerja dari DLS adalah adanya hamburan cahaya yang mengenai suatu partikel. Dengan teknik DLS, ukuran dari partikel dan molekul yang terdispersi atau terlarut dalam sebuah larutan dapat terukur, contohnya antara lain nanopartikel, dispersi koloid, emulsi dan mikroemulsi. Suatu partikel, emulsi dan molekul di dalam suspensi pada dasarnya memiliki gerak Brown, dan ketika partikel atau molekul disinari laser, intensitas cahaya yang terhambur berfluktuasi pada kecepatan yang bergantung pada ukuran partikelnya. Partikel yang lebih kecil akan digerakkan lebih jauh oleh molekul pelarut dengan kecepatan tinggi sehingga ukuran suatu partikel dapat ditentukan (Ulrich, 2002).

### 2.5.4 Analisis sifat termal

Analisis sifat termal menetapkan perubahan-perubahan yang terjadi untuk identifikasi suatu bahan, polimorfisme, penentuan kemurnian, stabilitas dan pencampuran dengan zat lain. Alat yang digunakan umumnya adalah *Differential Scanning Calorimetry*, yaitu alat yang memanaskan sampel pada kondisi tertentu dan mengukur berbagai macam sifat seperti titik leleh dan kapasitas panas. Titik leleh berkaitan dengan suhu transisi dari lipid yang digunakan dalam pembuatan liposom. Dalam DSC, bahan sampel dan bahan pembanding ditempatkan dalam wadah terpisah dan suhu setiap wadah dinaikkan atau diturunkan pada kecepatan yang sudah ditetapkan terlebih dahulu. Jika tidak terjadi perubahan pada sampel selama proses pemanasan, maka bahan sampel dan pembanding berada pada suhu yang sama. Apabila terjadi suatu perubahan pada sampel seperti pelelehan, energi

yang ada akan digunakan oleh sampel dan menyebabkan suhu dari sampel menjadi tetap konstan didalam wadah, sementara suhu dari pembanding akan terus meningkat. Oleh karena itu, terjadi perbedaan suhu antara sampel dengan pembanding. Hasil termogram DSC umumnya berupa laju aliran panas berbanding suhu, dimana peristiwa pelelehan adalah proses endotermik dan kristalisasi adalah proses eksotermik, dengan puncak peleburan sebanding dengan panas peleburan, yaitu  $\Delta H$  (Martin, Swarbrick, dan Cammarata, 1990).



## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasetika, Laboratorium Farmasi Fisik, dan Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok. Waktu penelitian dilakukan mulai dari bulan Februari hingga bulan Mei 2012.

### 3.2 Alat

Timbangan analitik, pH meter (Eutech, Singapura), *rotary evaporator* (Hahn Shin, Korea), pengaduk magnetik (IKA C-MAG HS7, Jerman), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1601, Jepang), *vortex mixer* (Health H-VM-300), *Mini-extruder kit* (Avanti Polar Lipids, Singapura), *GasTight® syringe* (Hamilton, Amerika), membran polikarbonat 0,4  $\mu\text{m}$  dan 0,2  $\mu\text{m}$  (Whatman), membran nylon Milipore 0,45  $\mu\text{m}$  (Whatman), *Scanning Electron Microscope* (Inspect F50), *Transmission Electron Microscope* (JEOL JEM-1400, Jepang), *Particle Size Analyzer* (Malvern Zetasizer, Inggris), *Differential Scanning Calorimetry* (Shimadzu DSC-60A, Jepang), *glass beads*, termometer, tabung sentrifugasi, *carbon tape conductivity*, desikator, labu bulat, oven, dan peralatan gelas lainnya.

### 3.3 Bahan

Fosfatidilkolin/lesitin (egg PC/*egg Phosphatidylcholine*) (Sigma Aldrich, Singapura), kolesterol (Sigma Aldrich, Singapura), asam palmitat (Merck, Jerman), spiramisin (Henan Topfond, Cina), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Mallinckrodt), kloroform p.a (Merck, Jerman), metanol (Merck, Jerman), aquadest bebas CO<sub>2</sub>, dapar fosfat pH 7,4 dan gas nitrogen (teknis).

### 3.4 Cara kerja

#### 3.4.1 Pembuatan Liposom

Liposom dibuat dengan dua formula yaitu dengan menambahkan asam palmitat pada formula kedua. Formulasi liposom dibawah ini menggunakan perbandingan rasio molar antara fosfatidilkolin atau lesitin, kolesterol dan asam palmitat. Dalam penggunaan pelarut, formulasi dibuat menggunakan perbandingan jumlah, yaitu fase air (dapar fosfat pH 7,4) : fase organik (kloroform) sebesar 2:1. Dibawah ini adalah formulasi pembuatan liposom yang digunakan untuk menghasilkan 50 mL suspensi liposom:

**Tabel 3.1.** Formulasi 50 mL suspensi liposom spiramisin

Bahan (mg)	Formula	
	F1	F2
Spiramisin	200	200
Fosfatidilkolin	800	800
Kolesterol	400	400
Asam palmitat	-	65
Pelarut (ml)		
<b>Fase organik :</b>		
Kloroform	25	25
<b>Fase air :</b>		
Dapar Fosfat pH 7,4	50	50

Keterangan:

F1 = Perbandingan rasio molar fosfatidilkolin : kolesterol : asam palmitat = 4 : 4 : 0

F2 = Perbandingan rasio molar fosfatidilkolin : kolesterol : asam palmitat = 4 : 4 : 1

Metode yang digunakan untuk membuat liposom adalah metode hidrasi lapis tipis yang sebelumnya juga disiapkan larutan dapar fosfat sebagai larutan hidrasi.

3.4.1.1 Pembuatan Liposom dengan Metode Hidrasi Lapis Tipis (Torchilin, Lukyanov, Klibanov, Omelyanenko, 1992; Lokling, Skurtveit, Fossheim, Smistad, Henriksen, dan Klaveness, 2003)

a. Pembuatan lapis tipis

Formulasi liposom dibuat dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis. Dua formulasi liposom dengan dan tanpa asam palmitat, ditimbang sesuai formula dan dilarutkan dalam 25 mL kloroform di dalam labu bulat ukuran 500 mL. Larutan dalam kloroform tersebut kemudian dievaporasi menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu  $\pm 60^{\circ}\text{C}$ , dan kecepatan 150 rpm, serta kondisi vakum untuk menguapkan kloroform sehingga terbentuk lapisan tipis. Lapisan tipis kemudian dialiri gas nitrogen untuk menghilangkan kloroform yang tersisa kemudian didiamkan selama 24 jam sebelum dihidrasi untuk menguatkan lapisan yang sudah terbentuk. Lapisan tipis yang dihidrasi selanjutnya akan menghasilkan liposom dengan bentuk MLV (*Multilamellar Vesicles*).

b. Prosedur hidrasi

Setelah 24 jam, lapis tipis di dalam labu bulat alat *rotary evaporator* tersebut dihidrasi dengan larutan dapar pH 7,4 sebanyak 50 mL yang telah dibuat sebelumnya, sambil dibantu pengelupasannya dengan *glass beads* hingga terbentuk suspensi berwarna putih susu. *Glass beads* merupakan biji atau manik-manik kecil yang terbuat dari kaca dengan permukaan yang halus, yang akan membantu pengelupasan secara mekanik dari lapisan tipis di dalam dinding labu tanpa merusak dinding labu tersebut. Suspensi yang terbentuk kemudian dihomogenkan dengan *vortex* dan kembali disimpan di dalam vial selama 24 jam di dalam lemari pendingin.

3.4.2 Ekstrusi Bertingkat dengan Membran berukuran 0,4  $\mu\text{m}$  dan 0,2  $\mu\text{m}$

Liposom spiramisin yang dibuat dari hidrasi lipid akan membentuk MUV (*Multilamellar Vesicles*) dan selanjutnya ukuran diameter liposom diperkecil dengan cara ekstrusi sehingga menghasilkan liposom LUV (*Large Unilamellar Vesicles*). Suspensi liposom yang telah dibuat kemudian diseragamkan ukurannya dengan metode ekstrusi bertingkat melewati membran polikarbonat berukuran 0,4  $\mu\text{m}$  dan 0,2  $\mu\text{m}$  sebanyak 5 siklus.

Metode ekstrusi bertingkat dilakukan dengan menggunakan alat *Mini-extruder* yang terdiri dari dua buah *Gas Tight® syringe* dan satu set rangkaian ekstruder. Membran yang akan digunakan diletakkan didalam rangkaian alat dan berada dalam kondisi terjepit dengan baik. Dua *syringe* berguna untuk melewati liposom pada membran yang digunakan. *Syringe* pertama berguna untuk mendorong cairan liposom masuk melewati membran dan *syringe* kedua menampung liposom yang telah diekstrusi dan begitu seterusnya hingga proses ekstrusi melewati membran memenuhi lima kali ekstrusi (lima siklus). Alat dijalankan diatas pemanas listrik dan diatur suhunya hingga  $\pm 60^{\circ}\text{C}$  yang dipantau suhunya dengan memasang termometer pada alat. Sebelum mengekstrusi liposom, sebanyak 1 mL larutan dapar fosfat pH 7,4 dilewatkan pada membran agar membran terbasahi. Dapar di dalam *syringe* kemudian dibuang dan diganti dengan 1 mL suspensi liposom. Hasil ekstrusi liposom kemudian ditampung di dalam vial, dan membran ekstrusi dipisahkan untuk dilakukan pencucian pada tahap selanjutnya.

Dua ukuran membran yang digunakan yaitu membran Whatman polikarbonat 0,4  $\mu\text{m}$  dan 0,2  $\mu\text{m}$  dipakai untuk menghasilkan liposom ekstrusi 0,4  $\mu\text{m}$  yang melewati membran 0,4  $\mu\text{m}$  sebanyak lima kali dan liposom ekstrusi 0,2  $\mu\text{m}$  yang melewati membran 0,4  $\mu\text{m}$  kemudian membran 0,2  $\mu\text{m}$  masing-masing sebanyak lima kali. Ekstrusi bertingkat sebanyak lima kali ini diharapkan mencapai distribusi ukuran yang lebih seragam dan meningkatkan intensitas liposom pada ukuran tertentu (Berger, Sachse, Bender, Schubert dan Brandl, 2001).

### 3.4.3 Pencucian Membran Hasil Ekstrusi dengan Metanol

Membran hasil ekstrusi yang telah dipisahkan kemudian dicuci dengan metanol. Membran dicelupkan ke dalam beaker yang berisi 10,0 mL metanol, kemudian diaduk menggunakan batang pengaduk selama 1 menit. Membran hasil ekstrusi selanjutnya diangkat dari larutan metanol menggunakan pinset dan larutan dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.. Sentrifugasi bertujuan agar liposom yang tepecah dengan metanol dapat terpisah, sehingga bagian supernatan dapat



dianalisa kadar spiramisin yang tertinggal pada membran dengan cara spektrofotometri.

#### 3.4.4 Pembuatan Spektrum Serapan dan Kurva Kalibrasi Spiramisin dalam Larutan Dapar Fosfat pH 7,4

Spiramisin ditimbang sebanyak 100,0 mg dan dilarutkan dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 di dalam labu ukur 100,0 mL. Larutan kemudian dicukupkan volumenya sedikit demi sedikit hingga tanda batas labu ukur, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan spiramisin dengan konsentrasi 1000 ppm diencerkan dengan cara memipet larutan sebanyak 10,0 ml, dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml, dan dicukupkan volumenya kembali dengan larutan dapar. Dari larutan spiramisin 100 ppm tersebut dibuat tujuh titik pengenceran untuk pembuatan kurva kalibrasi. Pengenceran larutan spiramisin 12 ppm diukur serapannya dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 sebagai *baseline* dan ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

Kurva kalibrasi dibuat dengan membuat larutan spiramisin dalam medium dapar fosfat pH 7,4 dengan konsentrasi 8, 10, 12, 14, 16, 20 dan 24 ppm. Masing-masing larutan tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya. Hasil pengukuran kemudian dibuat persamaan regresi linear untuk memperoleh kurva kalibrasi.

#### 3.4.5 Pembuatan Spektrum Serapan dan Kurva Kalibrasi Spiramisin dalam Metanol

Spiramisin ditimbang sebanyak 100,0 mg dan dilarutkan dalam metanol di dalam labu ukur 100,0 mL. Larutan kemudian dicukupkan volumenya sedikit demi sedikit hingga tanda batas labu ukur, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan spiramisin dengan konsentrasi 1000 ppm diencerkan dengan cara memipet larutan sebanyak 10,0 ml, dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml, dan dicukupkan volumenya kembali dengan larutan dapar. Dari larutan spiramisin 100 ppm tersebut dibuat tujuh titik pengenceran untuk pembuatan kurva kalibrasi. Pengenceran larutan spiramisin 12 ppm diukur

serapannya dengan metanol sebagai *baseline* dan ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

Kurva kalibrasi dibuat dengan membuat larutan spiramisin dalam metanol dengan konsentrasi 8, 10, 12, 14, 16, 20 dan 24. Masing-masing larutan tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya. Hasil pengukuran kemudian dibuat persamaan regresi linear untuk memperoleh kurva kalibrasi.

#### 3.4.6 Penentuan Jumlah Spiramisin pada Hasil Cucian Membran Ekstrusi

Bagian supernatan hasil cucian membran ekstrusi yang telah disentrifugasi diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah didapatkan menggunakan blanko metanol. Hasil serapan dicatat untuk kemudian diketahui konsentrasinya menggunakan persamaan pada kurva kalibrasi spiramisin dalam metanol. Jumlah spiramisin yang tertahan di membran ( $C_{\text{membran}}$ ) diperoleh dengan mengalikan konsentrasi spiramisin dengan volume metanol yang digunakan untuk mencuci membran.

#### 3.4.7 Karakterisasi Liposom

Dalam rangka meninjau karakter liposom yang dihasilkan, maka dilakukan berbagai evaluasi terhadap liposom. Evaluasi meliputi pengamatan terhadap hasil suspensi liposom secara organoleptis, bentuk dan morfologi liposom menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dan *Transmission Electron Microscope* (TEM), efisiensi penjerapan menggunakan metode dialysis, pengukuran distribusi ukuran partikel menggunakan *Particle Size Analyzer*, serta analisis sifat termal dari suhu transisi senyawa lipid yang ada di dalam pembuatan liposom menggunakan *Differential Scanning Calorimetry* (Laouini, Jaafar-Maalej, Charcosset dan Fessi, 2011).

##### 3.4.8.1 Organoleptis

Liposom dari kedua formula dapat diamati warna dan baunya dari suspensi liposom yang dihasilkan. Pengamatan dilakukan dari awal pembuatan hingga selesai penelitian dilakukan.

#### 3.4.8.2 Pengamatan Bentuk dan Morfologi Liposom

Morfologi dari kedua formulasi liposom diamati dengan melihat bentuk fisik globul liposom menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dengan perbesaran hingga 6000x. Sampel yang berupa cairan harus dikeringkan dengan meneteskan sedikit sampel pada *carbon tape conductivity*, suatu *tape* hitam yang sudah dipotong berukuran kecil, kemudian sampel dalam *tape* dikeringkan dalam desikator hingga sampel mengering (kurang lebih satu minggu). Preparasi ini diperlukan karena alat *Scanning Electron Microscope* (SEM) tidak dapat menganalisa sampel yang mengandung air.

Morfologi liposom secara lebih jelas juga dapat diamati dengan menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM). Pada penggunaan TEM, sampel yang berupa cairan dikeringkan terlebih dahulu. Sebanyak tiga tetes sampel ditambah dengan satu tetes ammonium asetat dan satu tetes ammonium molybdat diaduk sampai homogeny kemudian ditetesan diatas *copper grid* (tempat sampel) ditunggu hingga kering dan kemudian dianalisis dengan alat TEM dengan perbesaran sesuai yang diharapkan.

#### 3.4.8.3 Penentuan Efisiensi Penjerapan Liposom

Efisiensi penjerapan obat dilakukan pada liposom yang telah dibuat tanpa dilakukan ekstrusi, setelah diekstrusi dengan membran 0,4  $\mu\text{m}$  dan setelah diekstrusi dengan membran 0,2  $\mu\text{m}$ . Persen penjerapan spiramisin dalam liposom ditentukan dengan menghitung jumlah spiramisin yang tidak terjerap dalam liposom dengan metode dialisis. Pengukuran kadar spiramisin yang tidak terjerap dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis dan dialisis dilakukan dalam waktu 24 jam hingga mencapai serapan yang konstan. Serapan yang didapat kemudian dihitung dengan memasukkan ke dalam persamaan kurva kalibrasi.

Proses dialisis dilakukan dengan cara mengambil sampel sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam vial. Vial yang terbuka kemudian disisipkan membran 0,45  $\mu\text{m}$  dan dipasangkan dengan cincin kaca yang menahan dengan kuat membran. Pemasangan membran agar tidak terjadi kebocoran dibantu dengan mengisolasi kabel disekeliling antara cincin kaca dan mulut vial. Larutan dapar fosfat kemudian disiapkan dalam wadah beaker glass ukuran 250 mL. Vial berisi 2 mL liposom kemudian dikontakkan dengan 100 mL medium dapar fosfat pH 7,4

**Universitas Indonesia**

dalam kondisi terbalik, agar terjadi kontak antara liposom, membran dan medium. Dialisis dilakukan selama 24 jam dan larutan dalam medium dipipet 10 mL untuk diukur serapannya tiap 15 menit pada satu jam pertama, dan tiap 60 menit pada jam berikutnya. disertai dengan penggantian 10 mL larutan dapar fosfat hingga volume medium akan konstan sebesar 100 mL.

Obat yang larut dalam medium dalam setiap pengukuran merupakan obat yang tidak terjerap oleh liposom (terdialisis). Oleh karena itu, untuk mengetahui berat kumulatif obat yang terdialisis maka hasil pengukuran serapan dimasukkan ke dalam rumus berikut:

$$W_t = \frac{(y_t - a) \times m}{b \times 1000} \quad (3.1)$$

$$W_n = \frac{(y_n - a) \times s}{b \times 1000} + \dots + W_t \quad (3.2)$$

Dalam rumus tersebut,  $W_t$  adalah jumlah obat yang terdialisis dari sampel pada waktu pertama.  $Y_t$  adalah serapan sampel,  $m$  adalah volume medium reseptor,  $a$  dan  $b$  didapat dari persamaan kurva kalibrasi dan 1000 adalah faktor konversi dari  $\mu\text{g}$  ke  $\text{mg}$ . Sedangkan,  $W_n$  adalah berat kumulatif sampel jam berikutnya.  $Y_n$  adalah serapan sampel, dan  $s$  adalah volume sampel, seterusnya hingga jam terakhir pengambilan sampel. Setelah itu, persen efisiensi penyerapan spiramisin (%EP) oleh liposom dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% EP = \frac{C_{\text{terjerap}}}{C_{\text{total}}} \times 100\% \quad (3.3)$$

Efisiensi penyerapan spiramisin oleh liposom ditentukan dengan membandingkan konsentrasi spiramisin yang terjerap ( $C_{\text{terjerap}}$ ) dengan konsentrasi spiramisin total ( $C_t$ ). Konsentrasi spiramisin yang terjerap diperoleh dari hasil pengurangan konsentrasi spiramisin yang terdapat dalam formula dengan konsentrasi akumulatif spiramisin yang terdialisis.

#### 3.4.8.4 Pengukuran Distribusi Ukuran Partikel

Pengukuran distribusi ukuran dilakukan terhadap semua liposom yang dihasilkan, dari dua formulasi dan dari hasil ekstrusi. Distribusi ukuran partikel kedua formulasi liposom sebelum diekstrusi, ekstrusi  $0,4 \mu\text{m}$  dan ekstrusi  $0,2 \mu\text{m}$

ditentukan dengan menggunakan alat *Particle Size Analyzer (PSA)*. *Particle Size Analyzer (PSA)* memiliki kemampuan pengukuran yang baik dalam ukuran nanometer (kemampuan pengukuran hingga 0,1 nm). Sebelum pengukuran sampel, *aquadest* dimasukkan ke dalam *fluid tank* sebagai *baseline*. Sampel dimasukkan ke dalam *fluid tank* tetes demi tetes hingga konsentrasi mencukupi. Distribusi ukuran dalam sampel akan terukur melalui grafik yang dihasilkan.

#### 3.4.8.5 Analisis Sifat Termal

Sifat termal ditentukan dengan menggunakan alat *Differential Scanning Calorimetry (DSC)*. Sifat termal diamati dari masing-masing komponen lipid, yaitu sampel tunggal fosfatidilkolinlesitin, kolesterol, dan asam palmitat serta masing-masing campuran lipid pada lapis tipis formula 1 dan 2 (keduanya tanpa zat aktif). Sejumlah kecil sampel ditimbang dan diletakkan dalam *pan/silinder* alumunium berdiameter 5 mm. *Silinder/pan* tersebut ditutup dengan lempengan alumunium kemudian dimasukkan ke dalam alat DSC. Pengukuran dilakukan mulai dari suhu 30-250°C dengan laju pemanasan 10°C/menit. Proses eksotermik dan endotermik yang terjadi pada sampel akan tercatat pada rekorder.

## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pembuatan Liposom (Metode Hidrasi Lapis Tipis)

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah pembuatan liposom dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis. Metode ini melibatkan dua proses utama, yaitu pembuatan lapis tipis yang meliputi penguapan atau penghilangan pelarut organik yang sudah mengandung komponen lipid dan hidrasi lapis tipis dengan menggunakan medium dapar fosfat pH 7,4. Alat utama yang dibutuhkan adalah *rotary evaporator* dan vakum agar pelarut organik yang digunakan aman dan tidak menguap bebas ke lingkungan. Dibuat dua formulasi liposom yaitu liposom konvensional dengan menggunakan lesitin/*egg PC* (*egg phosphatidylcholine*) dan kolesterol, serta penambahan asam palmitat pada formula kedua sesuai dengan formulasi pada Tabel 3.1. Asam palmitat ditambahkan pada pembuatan liposom untuk mengetahui pengaruh sifat asam lemak yang ditambahkan terhadap sifat fleksibilitas liposom. Zat aktif yang digunakan adalah antibiotik makrolida spiramisin dan digunakan sebesar 200 mg untuk 50 mL suspensi yang dihasilkan.

#### 4.1.1 Pembuatan Lapis Tipis

Lapis tipis dibentuk dalam labu bulat yang bersih dan telah dikeringkan dalam oven. Dalam penelitian ini, semua bahan komponen lipid dan zat aktif dilarutkan dalam 25 mL kloroform dan menggunakan dapar fosfat pH 7,4 sebanyak 50 mL sehingga diperoleh perbandingan pelarut fase air terhadap fase organik sebesar 2:1. Berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa perbandingan volume pelarut fase air dan fase organik 2:1 adalah rasio yang optimal untuk memproduksi liposom dengan ukuran rata-rata dan distribusi ukuran yang kecil (Laouini, Jaafar-Maalej, Sfar, Charcosset, dan Fessi, 2011). Spiramisin sebagai zat aktif dilarutkan ke dalam fase organik karena kelarutannya dalam kloroform lebih baik dibandingkan didalam air (Moffat, Osselton, dan Brian, 2005).

Pada pembuatan lapis tipis yang menggunakan kloroform ini, pada pengerjaannya peneliti harus memakai masker filter dan setiap wadah yang mengandung kloroform harus ditutup rapat dengan bantuan penutup *plastic wrap*.

**Universitas Indonesia**

Kloroform digunakan sebagai pelarut lipid karena mudah menguap pada suhu 60°C dan pada suhu tersebut tidak merusak komposisi dari lipid yang digunakan.

Proses selanjutnya adalah penguapan kloroform untuk pembentukan lapis tipis di dalam labu. Labu bulat yang sudah berisi larutan lipid kemudian dipasangkan pada alat *rotary evaporator*. Pada percobaan pendahuluan, dicari suatu kondisi penggunaan alat yang menghasilkan lapisan tipis paling baik berupa lapisan tipis yang merata di separuh volume dinding labu. Ukuran labu yang digunakan juga menentukan keberhasilan pembentukan lapis tipis. Dalam penelitian ini, digunakan 25 mL kloroform sehingga sebaiknya digunakan labu ukuran 250 mL atau yang lebih besar. Kondisi alat yang harus dicapai adalah proses vakum yang tepat, suhu dan kecepatan putar dari labu bulat. Waktu yang dibutuhkan untuk pembuatan lapis tipis adalah relatif, yakni bergantung banyaknya kloroform yang digunakan untuk divakum. Kondisi vakum sangat dibutuhkan untuk menghilangkan kloroform hingga terbentuk suatu lapisan tipis. Lapis tipis yang merata diperoleh dari alat *rotary evaporator* yang diatur kecepatannya hingga 150 rpm, suhu 60°C, dan proses vakum yang dinyalakan secara bertahap.

Lapis tipis dibentuk dengan cara memutar labu dengan kecepatan 150 rpm agar larutan berputar dan volumenya naik hingga setengah volume labu. Suhu 60°C dari *waterbath* alat *rotary evaporator* juga harus dicapai untuk memanaskan labu hingga mencapai suhu transisi dari larutan lipid. Pada kondisi larutan sudah terus berputar mengelilingi setengah volume labu, barulah vakum dihidupkan hingga kloroform habis menguap dan meninggalkan lapisan tipis di permukaan dinding labu.

Terlihat larutan lipid yang saat dipanaskan dan diuapkan membentuk lapisan gel dan kemudian menjadi lapisan tipis karena terus diputar dan divakum. Lapis tipis yang telah terbentuk kemudian dialiri gas N<sub>2</sub> selama kurang lebih 15 menit untuk mengusir pelarut kloroform yang tersisa dan mengusir gas oksigen yang dapat mengoksidasi lipid. Lapis tipis dalam labu kemudian disimpan selama 24 jam dalam lemari pendingin untuk menguatkan pembentukan lapis tipis.

#### 4.1.2 Hidrasi Lapis Tipis

Lapis tipis di dalam labu bulat yang telah didiamkan selama 24 jam dalam lemari pendingin selanjutnya dipasangkan kembali pada alat *rotary evaporator*. Pada proses hidrasi yang hanya bertujuan untuk membentuk globul liposom dari lipid lapis tipis yang telah dibuat, maka vakum pada alat *rotary evaporator* tidak perlu dinyalakan. Namun, dibutuhkan suatu bola-bola kaca kecil yang halus untuk membantu proses hidrasi yang disebut dengan *glass beads*. Dalam penelitian ini, jumlah pelarut air yang dibutuhkan untuk hidrasi adalah dengan perbandingan fase air : fase organik yaitu 2:1. Dari segi ukuran partikel liposom, ukuran partikel terkecil diperoleh dari liposom yang dibuat dengan perbandingan fase air : fase organik sebesar 2:1. Oleh karena itu, pada penggunaan 25 mL kloroform, pada saat hidrasi ditambahkan 50 mL dapar fosfat sehingga diperoleh 50 mL suspensi liposom.

Biji/manik-manik kecil yang halus dan terbuat dari kaca (disebut dengan *glass beads*) dimasukkan ke dalam labu yang telah berisi dapar fosfat. *Glass beads* yang dimasukkan ini bertujuan untuk membantu pengelupasan lapisan tipis lipid dengan cara mekanik, dimana *glass beads* yang ikut berputar akan memberi penekanan sehingga lapisan tipis tercampur sempurna dengan larutan dapar. Proses hidrasi diawali penambahan larutan dapar, sejumlah *glass beads*, dan diputar dengan kecepatan putar antara 50 rpm hingga 150 rpm, dengan suhu yang sama saat pembuatan lapis tipis, yaitu 60°C. Pada proses ini, waktu yang dibutuhkan mencapai satu jam untuk mendapatkan hidrasi yang sempurna dari lapis tipis dan diperoleh 50 mL suspensi liposom yang kemudian divortex dan disimpan dalam lemari pendingin sebelum dilakukan pengujian untuk karakterisasi.

#### 4.2 Ekstrusi Bertingkat dengan Membran Polikarbonat 0,4 µm dan 0,2 µm

Suspensi liposom yang telah dibuat selanjutnya diekstrusi melewati membran 0,4 µm dan 0,2 µm dengan alat *Mini-extruder kit*. Alat yang hendak dipakai terlebih dahulu dibersihkan sesuai petunjuk pemakaian. Hal ini dimaksudkan agar tidak ada liposom yang tersisa pada serangkaian alat atau pengotor yang dapat menghambat pergerakan liposom melewati membran.



Membran yang dipakai juga diletakkan dengan tepat dan tidak berlipat agar tidak terjadi kebocoran membran yang sulit dilihat oleh mata akibat ukuran porinya yang terlalu kecil. Sebelum liposom diekstrusi, 1 mL dapar fosfat pH 7,4 dilewatkan pada *Mini-extruder kit* untuk membasahkan membran. Dapar fosfat pH 7,4 hanya untuk membasahkan sehingga tidak perlu ditampung, kemudian 1 mL liposom dilewatkan pada membran untuk diekstrusi.

Pada saat proses ekstrusi dilakukan, suhu merupakan parameter yang perlu diperhatikan. *Mini-extruder kit* dipasangkan pada *holder/heating block*, yaitu balok pemanas yang menghantarkan panas dengan baik jika dipanaskan di atas *heater*. Suhu harus dijaga sekitar 60°C untuk mencapai suhu transisi lipid yang merupakan faktor utama proses ekstrusi dari liposom yang berupa vesikel fosfolipid. *Syringe* yang digunakan untuk mendorong liposom melewati membran harus terpasang dengan benar agar tidak terjadi kebocoran. Liposom dalam *syringe* pertama didorong melewati membran secara perlahan sehingga memasuki *syringe* kedua. Penekanan yang terjadi saat proses ekstrusi ini tidak boleh dipaksakan. Hal ini bertujuan untuk menghindari kebocoran pada membran yang ditandai dengan kemudahan mendorong liposom melewati membran.

Pada tahapan ekstrusi melewati membran polikarbonat 0,2 µm, proses ekstrusi memberikan penekanan yang lebih berat bila dibandingkan ekstrusi melewati membran polikarbonat 0,4 µm. Hal ini terjadi karena pada membran polikarbonat 0,2 µm memiliki ukuran pori yang lebih kecil dibandingkan membran polikarbonat 0,4 µm. Liposom hasil ekstrusi menunjukkan suspensi liposom berupa sistem koloid dengan warna yang lebih putih (putih susu), bila dibandingkan dengan liposom awal berupa sistem koloid yang berwarna putih kekuningan.

#### **4.3 Pembuatan Spektrum Serapan dan Kurva Kalibrasi Spiramisin dalam Dapar Fosfat pH 7,4**

Pada perhitungan efisiensi penyerapan, spiramisin yang tidak terjerap dalam liposom dihitung kadarnya dalam medium dapar fosfat pH 7,4. Kelarutan spiramisin dalam air adalah 1:50 sehingga dapat dibuat larutan induk spiramisin 1000 ppm dalam dapar fosfat pH 7,4. Kurva serapan spiramisin dalam larutan

dapar fosfat pH 7,4 dengan konsentrasi 12 ppm menghasilkan panjang gelombang maksimum 231,5 nm. Kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 dibuat dengan konsentrasi 8, 10, 12, 16, 20, dan 24 ppm. Pembuatan kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 menghasilkan persamaan garis  $y = 0,0311x + 0,0050$  dengan nilai  $r = 0,9999$ .

#### **4.4 Pembuatan Spektrum Serapan dan Kurva Kalibrasi Spiramisin dalam Metanol**

Pada penentuan efisiensi penjerapan, spiramisin yang tertinggal saat ekstrusi diperhitungkan kadarnya dalam metanol. Spiramisin mudah larut dalam metanol dan metanol diperlukan untuk memecah sedikit liposom yang tertinggal saat ekstrusi. Kurva serapan spiramisin dalam metanol dengan konsentrasi 12 ppm menghasilkan panjang gelombang maksimum 231,5 nm. Kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 dibuat dengan konsentrasi 8, 10, 12, 14, 16, 20, dan 24 ppm. Pembuatan kurva kalibrasi spiramisin dalam metanol menghasilkan persamaan garis  $y = 0,0309x + 0,0080$  dengan nilai  $r = 0,9999$ .

#### **4.5 Penentuan Jumlah Spiramisin yang Tertinggal pada Membran Ekstrusi**

Pada proses ekstrusi, lapisan *bilayer* liposom dapat pecah dan tidak lagi membentuk vesikel sehingga spiramisin yang telah terjerap menjadi terlepas dari liposom. Spiramisin yang terlepas ini dapat terjerap kembali oleh vesikel liposom setelah liposom diekstrusi melewati membran atau tetap terlepas dan berada dalam fase air dari suspensi liposom. Pada membran yang digunakan untuk ekstrusi, dapat ditemukan sisa liposom maupun spiramisin yang terlepas dari liposom sebagai kemungkinan jumlah spiramisin yang tertinggal pada membran. Penentuan jumlah spiramisin yang tertinggal pada membran ekstrusi diperhitungkan agar dapat diketahui konsentrasi spiramisin pada liposom setelah proses ekstrusi berlangsung.

Setelah liposom diekstrusi sebanyak 5 siklus, membran ekstrusi polikarbonat dilepas dari rangkaian alat dan dicuci dengan metanol untuk melarutkan spiramisin yang tertahan dan memecah lipid dari liposom yang masih menjerap spiramisin. Hasil cucian yang disentrifugasi akan menghasilkan bagian

mengendap berupa lipid di dasar tabung sentrifugasi dan supernatan yang mengandung spiramisin. Supernatan kemudian dipipet dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan jumlah spiramisin yang tertahan pada membran ekstrusi. Jumlah spiramisin yang tertahan pada membran ( $C_{\text{membran}}$ ) dihitung dengan mengalikan kadar spiramisin rata-rata dengan volume metanol yang digunakan. Jumlah spiramisin yang dihasilkan tidak besar karena hanya sedikit spiramisin yang tertinggal dalam membran saat proses ekstrusi berlangsung. Perhitungan dan hasil jumlah spiramisin yang tertinggal pada membran dapat dilihat pada lampiran.

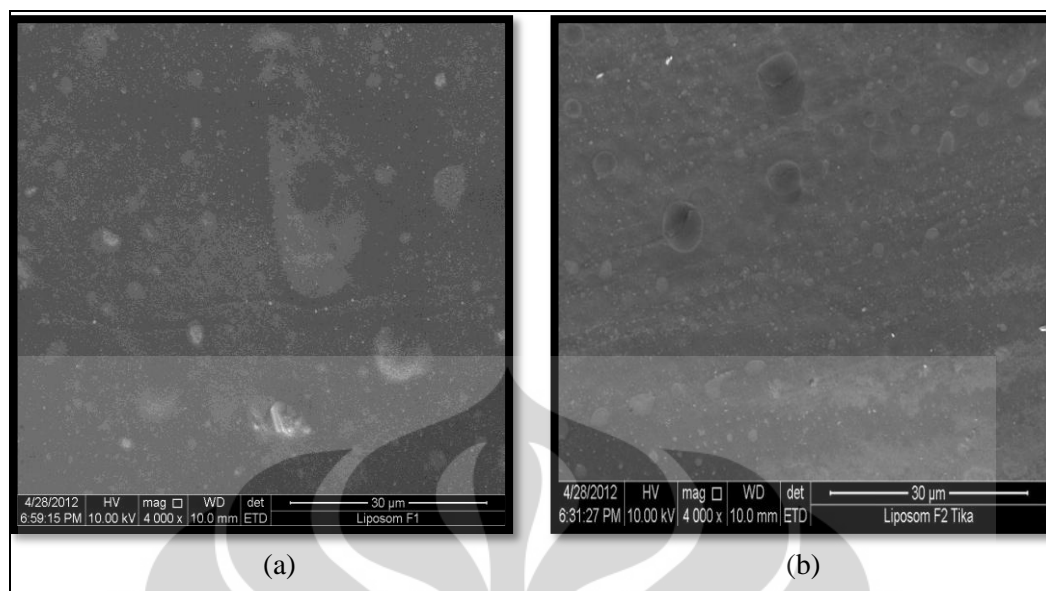
## 4.6 Karakterisasi Liposom

### 4.6.1 Organoleptis

Keberhasilan pembuatan liposom yang berupa suspensi nanopartikel dalam dapar fosfat pH 7,4 dapat dilihat secara organoleptis sebagai larutan koloid yang stabil dalam penyimpanan, berwarna putih susu agak kekuningan dan berbau lesitin. Pada dua formulasi yang dibuat, penambahan asam palmitat tidak memperlihatkan perbedaan secara nyata. Asam palmitat memiliki pemerian berupa serbuk berwarna putih sehingga tidak mempengaruhi warna maupun kekentalan dari suspensi liposom. Dalam penyimpanannya di lemari pendingin selama dua bulan, suspensi liposom tetap stabil dan tidak terpisah maupun mengendap. Dapat pula terjadi sedikit pengendapan di bagian bawah suspensi, namun hal ini dapat diatasi dengan cara menghomogenkan kembali suspensi liposom dengan vortex dalam waktu kurang lebih lima menit.

### 4.6.2 Bentuk dan Morfologi Liposom dengan *Scanning Electron Microscope*

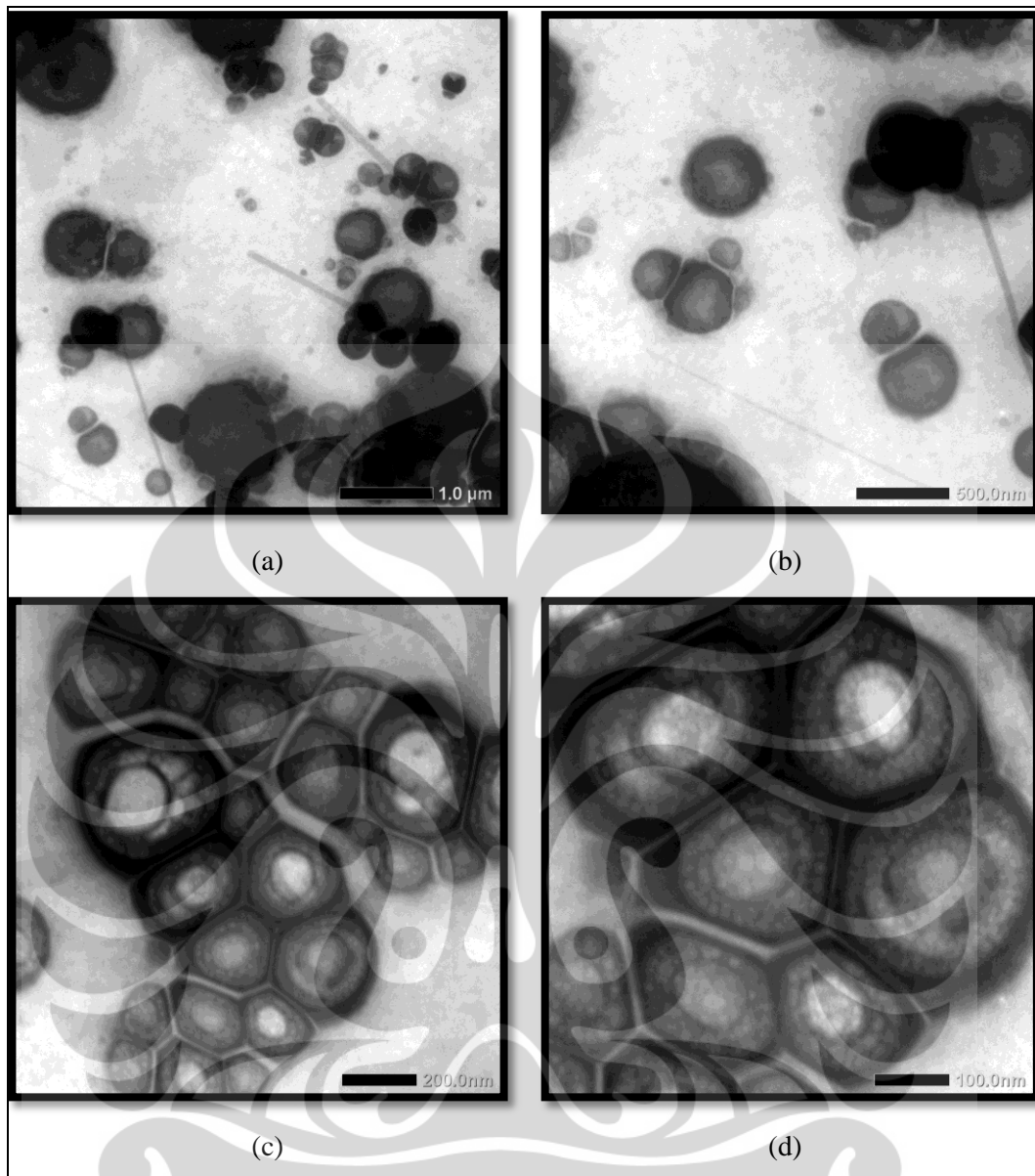
Bentuk dan morfologi dua formula liposom yang pertama kali dibuat (tanpa diekstrusi) diamati dengan *Scanning Electron Microscope* perbesaran 4000x hingga 6000x. Gambar 4.1 adalah mikrograf liposom formula 1 dan formula 2 dengan *Scanning Electron Microscope* yang memperlihatkan bentuk vesikel-vesikel liposom dengan bentuk bulat yang sangat kecil.



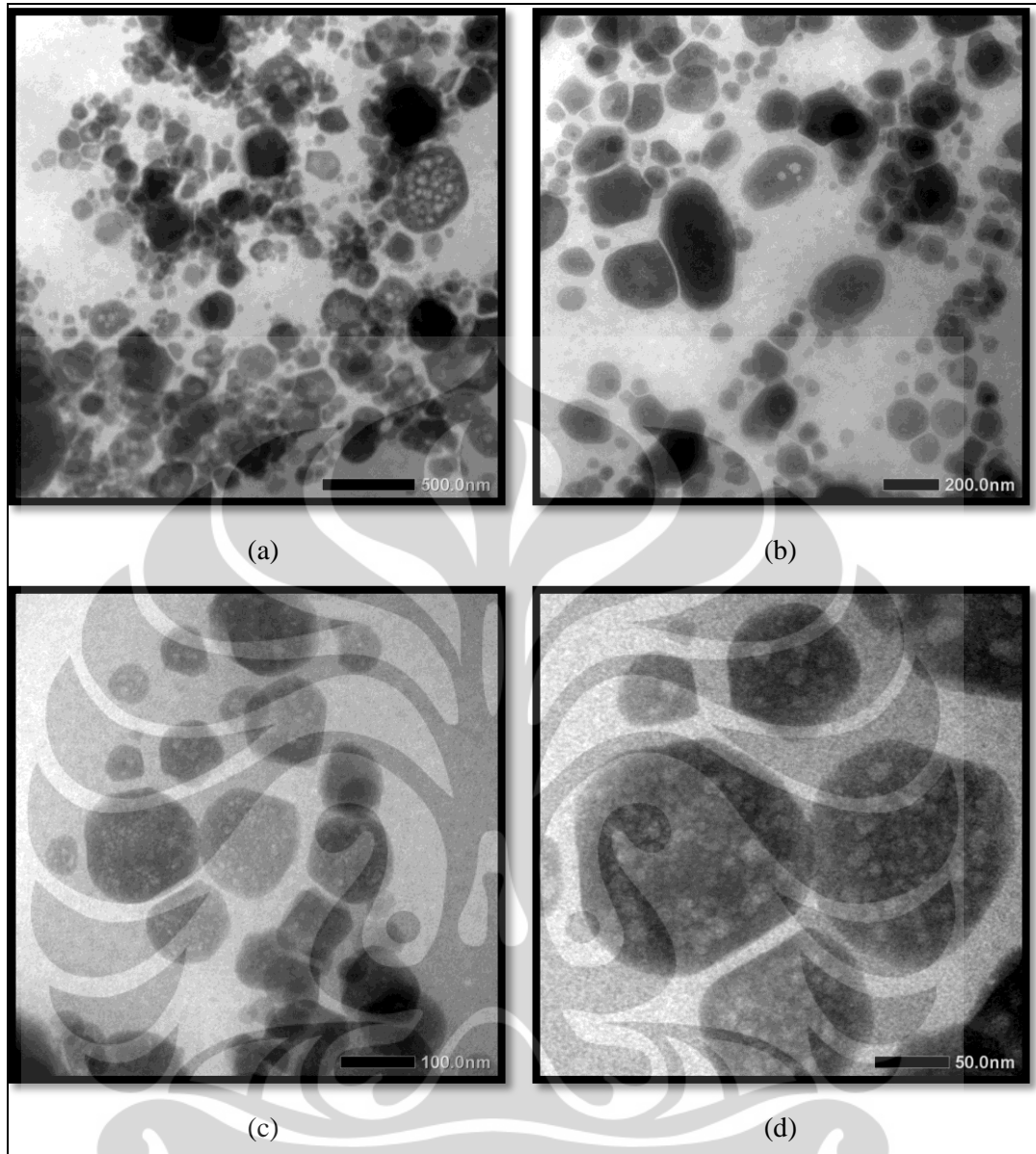
**Gambar 4.1.** Mikrograf *Scanning Electron Microscope* dua formula liposom dengan perbesaran 4000x (a) formula 1 dan (b) formula 2

#### 4.6.3 Bentuk dan Morfologi Liposom dengan TEM

Bentuk dan morfologi dua formula liposom diamati pula dengan *Transmission Electron Microscope* untuk melihat dengan jelas vesikel yang terbentuk dari suatu liposom. Hasil yang lebih jelas pada hasil mikrograf TEM didapat dari perbesaran objek hingga 40000x dan 8000x. Gambar 4.2 dan 4.3 terlihat dengan jelas vesikel liposom dengan bentuk bulat dan multilamela. Kedua gambar berasal dari formula 1 dan 2 liposom awal yang pertama kali dibuat (tanpa ekstrusi).



**Gambar 4.2.** Mikrograf *Transmission Electron Microscope* liposom formula 1 dengan perbesaran (a) 5000x, (b) 10000x, (c) 20000x, (d) 40000x



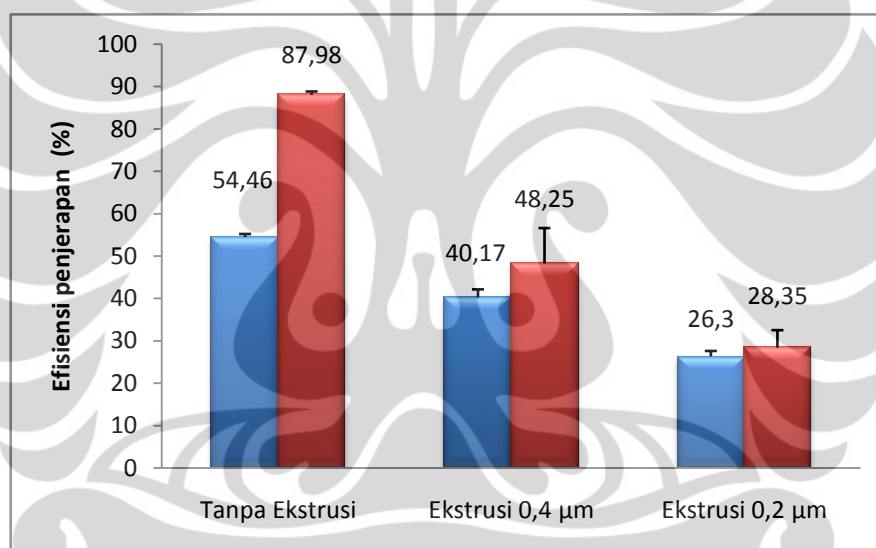
**Gambar 4.3.** Mikrograf *Transmission Electron Microscope* liposom formula 2 dengan perbesaran (a) 10000x, (b) 15000x, (c) 40000x, (d) 80000x

#### 4.6.4 Penentuan Efisiensi Penjerapan Spiramisin dalam Liposom

Liposom formula 1 dan 2 sebelum diekstrusi, ekstrusi 0,4  $\mu\text{m}$  dan ekstrusi 0,2  $\mu\text{m}$  diuji penjerapannya dengan dialisis masing-masing dalam waktu 24 jam. Pengujian dialisis menghasilkan data serapan yang terdapat pada Lampiran 21-32. Jumlah terdialisis dihitung dalam persen sebagai persen obat yang tidak terjerap sehingga menghasilkan data persen efisiensi penjerapan. Hasil evaluasi efisiensi penjerapan kedua formula liposom dengan tiga perlakuan yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 4.4.

Universitas Indonesia

Liposom ekstrusi 0,4  $\mu\text{m}$  diperoleh dari liposom yang dilewatkan pada membran polikarbonat 0,4  $\mu\text{m}$  dan liposom ekstrusi 0,2  $\mu\text{m}$  diperoleh dari liposom yang dilewatkan pada membran polikarbonat 0,4  $\mu\text{m}$  dilanjutkan dengan membran polikarbonat 0,2  $\mu\text{m}$ . Efisiensi penyerapan semakin berkurang pada liposom seiring dengan meningkatnya jumlah ekstrusi. Ekstrusi yang memberi tekanan pada liposom saat liposom dipaksa untuk melewati ukuran pori tertentu dapat merubah ukuran partikel serta kemampuan penyerapan liposom. Berubahnya kemampuan penyerapan diakibatkan oleh vesikel liposom berupa lipid lapis ganda yang sudah menyerap zat aktif dapat terpecah dan tidak menyerap zat aktif kembali. Hal ini terlihat dari penyerapan yang terus menurun setelah liposom diekstrusi secara bertingkat.



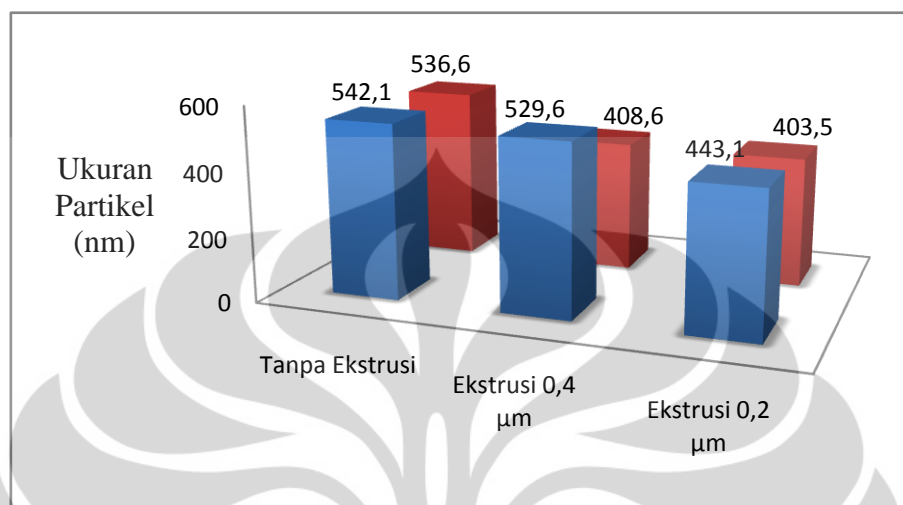
Keterangan: ■ = Formula 1, ■ = Formula 2

**Gambar 4.4.** Hasil efisiensi penyerapan dua formula liposom

#### 4.6.5 Distribusi Ukuran Partikel Liposom

Penentuan distribusi ukuran partikel liposom dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* menunjukkan berkurangnya ukuran partikel liposom setelah diekstrusi bertingkat melewati membran 0,4 dan 0,2  $\mu\text{m}$ . Hasil pengukuran menunjukkan ukuran partikel liposom awal (sebelum diekstrusi), ekstrusi dengan membran 0,4  $\mu\text{m}$  dan ekstrusi dengan membran 0,2 berada pada populasi 542,1; 529,6; dan 443,1 nm untuk formula 1 dan 536,6; 408,6; dan 403,5 nm untuk

formula 2. Penurunan ukuran partikel yang dialami kedua formula terdapat pada Gambar 4.5. Populasi distribusi ukuran yang semakin homogen dapat dilihat pada hasil pengukuran distribusi ukuran pada Lampiran 12 dan 13.



Keterangan: ■ = Formula 1, ■ = Formula 2

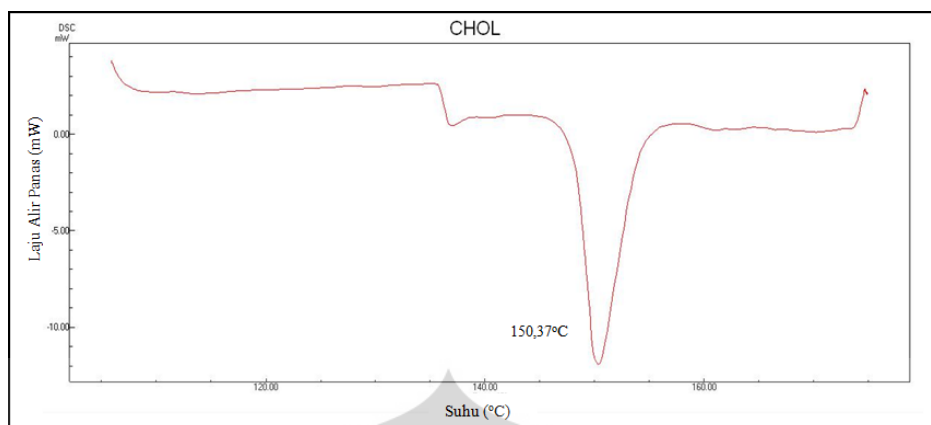
**Gambar 4.5.** Penurunan ukuran partikel liposom sebelum dan sesudah ekstrusi

#### 4.6.6 Analisis Sifat Termal

Karakterisasi fisik liposom selanjutnya dilakukan dengan metode *Differential Scanning Calorimetry* (DSC). *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) digunakan untuk melihat ada/tidaknya perubahan suhu transisi dari lipid yang digunakan. *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) juga secara tidak langsung menentukan kemurnian dari sampel yang dilihat dari titik lebur. Prinsipnya adalah mengukur besarnya panas yang diserap atau dibebaskan selama proses pemanasan atau pendinginan (Martin, Swarbrick, dan Cammarata, 1990).

Pada sampel tunggal dari komponen lipid penyusun liposom, yaitu kolesterol dan asam palmitat, masing-masing memiliki satu puncak (*peak*) yang menandakan kemurnian dari sampel. Sampel tunggal dari kolesterol dan asam palmitat memiliki titik lebur berturut-turut sebesar 150,37°C dan 65,56°C. Gambar 4.6 adalah contoh termogram yang ditunjukkan oleh sampel tunggal kolesterol yang digunakan dengan kemurnian 95% :





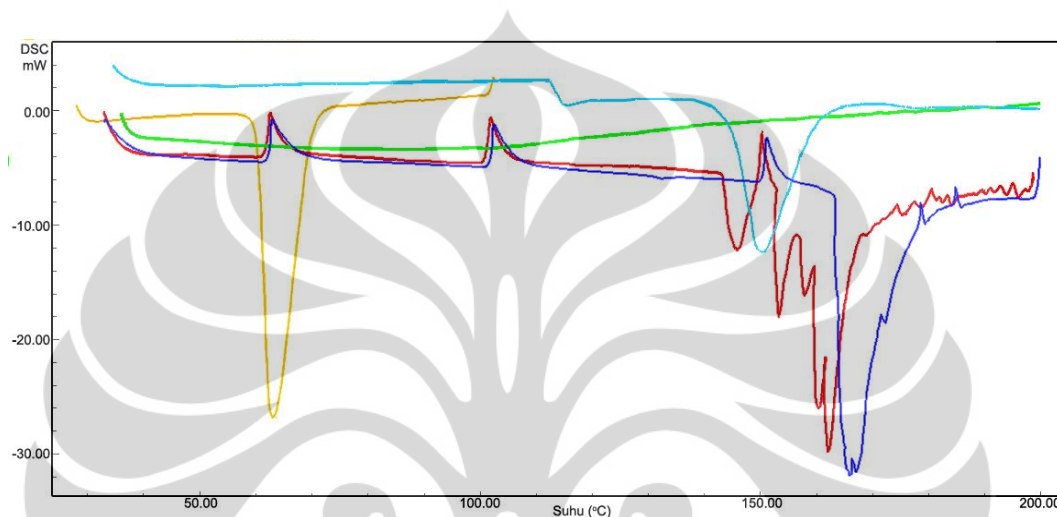
**Gambar 4.6.** Contoh termogram kolesterol dengan DSC.

Sedangkan untuk sampel tunggal berupa fosfatidilkolin/lesitin tidak dapat ditentukan puncak dari termogram yang diakibatkan ketidakmurnian dari sampel serta sifat lesitin yang tidak tahan panas. Lesitin yang labil dan sensitif terhadap panas akan rusak saat panas dari alat mengalir melalui sampel. Oleh karena itu, pada penyimpanannya juga, lesitin/fosfatidilkolin harus disimpan dalam suhu rendah.

Campuran lipid yang berasal dari formula satu dan formula dua yang telah terbentuk menjadi suatu lapis tipis kemudian dianalisis untuk mengetahui perubahan-perubahan yang terjadi. Dua sampel berupa campuran lipid ini tidak mengandung zat aktif berupa spiramisin. Dalam pengukurannya, dilakukan tahap *hold* (penahanan sementara) selama dua menit pada suhu 60°C, 100°C, dan 150°C. Pada awalnya, hal ini bertujuan agar munculnya suatu puncak saat pengukuran tidak terabaikan pada suhu *hold* tersebut. Proses pengukuran secara umum adalah sampel diberi panas dengan kenaikan suhu sebesar 10°C/menit. Akibatnya, adanya *hold* pada tiga titik suhu yang digunakan menunjukkan tiga puncak eksoterm pada dua sampel, baik untuk formula satu dan formula dua. Hal ini menunjukkan bahwa, seharusnya tidak digunakan metode *hold* dalam analisis campuran lipid dalam sampel.

Perubahan yang dapat diamati pada sampel formula satu dan formula dua terjadi pada suhu sekitar 150°C, dimana suhu tersebut berada dalam rentang titik lebur dari kolesterol yang digunakan. Sedangkan adanya asam palmitat pada

formula kedua tidak terdeteksi puncak endotermnya bila dibandingkan dengan asam palmitat yang telah terukur sebelumnya pada suhu 65,56°C (dalam sampel tunggal). Hal ini dapat terjadi karena asam palmitat telah berfusi dengan kolesterol sehingga suhu lebur dari kedua campuran juga semakin tinggi bila dibandingkan dengan suhu lebur kolesterol sebelumnya. Seluruh termogram sampel dapat dilihat pada hasil overlay yang tertera pada Gambar 4.7.



Keterangan :  
 Hijau : sampel tunggal lesitin/fosfatidilkolin (kemurnian  $\pm 76.5\%$ )  
 Kuning : sampel tunggal asam palmitat (kemurnian  $\pm 98.7\%$ )  
 Biru muda: sampel tunggal kolesterol (kemurnian  $\pm 95\%$ )  
 Merah: sampel campuran lipid pada liposom tanpa obat formula 1  
 Biru tua: sampel campuran lipid pada liposom tanpa obat formula 2

**Gambar 4.7.** Termogram *overlay* hasil analisis dengan DSC

Tabel 4.1 menunjukkan data seluruh puncak endotermik yang terdapat pada semua sampel. Campuran lipid dari lapis tipis formula satu yang hanya mengandung lesitin dan kolesterol, mengalami kenaikan suhu lebur di sekitar suhu lebur kolesterol. Sedangkan kenaikan suhu lebur lebih besar lagi terjadi pada campuran lipid lapis tipis pada formula dua yang ditambahkan asam palmitat. Hal ini menjelaskan bahwa adanya interaksi kimia pada kolesterol dan lesitin maupun asam palmitat sehingga menaikkan suhu lebur dari sampel. Semakin tinggi suhu lebur campuran yang dihasilkan, maka dapat diketahui bahwa campuran tersebut akan semakin *rigid*. Kenaikan sifat rigiditas atau kekakuan dari campuran lipid pembentuk liposom ini dapat berpengaruh terhadap kemampuan penyerapan sehingga jumlah yang terjerap lebih besar dibanding liposom tanpa asam palmitat,

sehingga efisiensi penyerapan liposom formula dua lebih tinggi dibandingkan liposom formula satu (Gambar 4.4). Di bawah ini adalah tabel data hasil pengukuran sifat termal semua sampel dengan DSC, semua sampel mengalami puncak endotermik dengan suhu lebur yang berbeda-beda.

**Tabel 4.1.** Data hasil pengukuran analisis sifat termal

Sampel	Titik Lebur (°C)	Jarak Peleburan (°C)	Kapasitas Panas Peleburan/ $\Delta H$ (kJ/kg)
Lesitin	Tidak teridentifikasi	Tidak teridentifikasi	Tidak teridentifikasi
Kolesterol	150,37	148,32 - 154,19	67,58
Asam Palmitat	65,56	63,15 - 71,65	13,11
Liposom F1	145,80	143,25 - 153,33	7,58
	153,61	157,16 - 160,04	10,76
	1657,86	159,85 - 163,51	2,58
	160,48	161,56 - 169,73	6,23
	162,26		6,59
Liposom F2	166,40	163,44 - 169,72	101,10

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Liposom spiramisin berhasil dibuat dengan penambahan asam palmitat menggunakan metode ekstrusi bertingkat melalui membran polikarbonat berukuran pori 0,4  $\mu\text{m}$  dan 0,2  $\mu\text{m}$ .
2. Liposom multilamela diperoleh dengan ukuran partikel rata-rata yang menurun sebesar 536, 408, dan 403 nm setelah dilakukan ekstrusi bertingkat. Ekstrusi bertingkat juga menurunkan efisiensi penjerapan yaitu dari  $87,98 \pm 0,73\%$ , menjadi  $48,15 \pm 4,01\%$ , dan  $28,35 \pm 1,18\%$ .
3. Hasil analisa termal menunjukkan asam palmitat meningkatkan sifat rigiditas dari liposom sehingga liposom spiramisin dengan penambahan asam palmitat memiliki nilai efisiensi penjerapan yang lebih baik. Liposom tanpa asam palmitat dan liposom dengan asam palmitat memiliki efisiensi penjerapan berturut-turut sebesar  $54,46 \pm 0,40\%$  dan  $87,98 \pm 0,73\%$ , sebelum dilakukan ekstrusi bertingkat.

#### **5.2 Saran**

Perlu dilakukan pada penelitian selanjutnya terhadap tingkat penambahan asam palmitat agar diketahui formula untuk mencapai efisiensi penjerapan yang optimum. Selain itu, perlu dilakukan optimasi terhadap jumlah zat aktif dan jenis lain dari asam lemak yang digunakan, sehingga didapatkan formula liposom dengan kemampuan penjerapan terbaik.

## DAFTAR ACUAN

- Barenholz, Y., dan Crommelin, D. J. (1994). Liposomes as Pharmaceutical Dosage Forms. Dalam J. Swarbrick, dan J. C Boylan, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Third ed., Vol. 9* (hal. 1-39). New York: Marcel Dekker.
- Berger, N., Sachse A., Bender J., Schubert, R., dan Brandl, M. (2001). Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 223, 55-68.
- Biju, S. S., Talegaonkar, S., Mishra, P. R., dan Khar, R. K. (2006). Vesicular Systems : An overview. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 142-144.
- Connor, J., Yatvin, M. B., dan Huang, L., (1983). pH-Sensitive liposomes: Acid-induced liposome fusion. *Journal of Biophysics: Proc Natl Acad Sci, USA* 81.
- Drulis-Kawa, Z., dan Dorotkiewicz-Jach, A. (2009) Liposomes as delivery systems for Antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 387, 187-198.
- Frydman, A.M., Le, R. Y., Desnottes, J. F., (1988). Pharmacokinetics of spiramycin in man. *Journal of Antimicrob Chemother*, 93-103.
- Garcia-Jimeno, S., Escribano, E., Queralt, J., dan Estelrich, J. (2011). Magnetoliposomes prepared by reverse-phase followed by sequential extrusion: Characterization and possibilities in the treatment of inflammation. *International Journal of Pharmaceutics*, 405, 181-187.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 15-39.
- Jain, K. K. (2008). *Drug Delivery Systems*. USA: Humana Press, 1-2.
- 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.
- Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Charcosset, C. dan Fessi, H. (2011). Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor-Application to spironolactone encapsulation. *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.
- Lee, Chris., Barnett, J., dan Reaven, P. D. (1998). Liposomes enriched in oleic acid are less susceptible to oxidation and have less proinflammatory activity when exposed to oxidizing conditions. *Journal of Lipid Research*, 39.
- Lokling, K., Fossheim, S. L., Bjornerud, A., dan Klaveness, J. (2001). pH-Sensitive paramagnetic liposomes as MRI contrast agents: in vitro feasibility studies. *Journal of Magnetic resonance Imaging*, 19, 731-738.
- Lokling, K., Skurtveit, R., Fossheim, S. L., Smistad, K., Henriksen, W., dan Klaveness, J. (2003). pH-Sensitive paramagnetic liposomes for MRI: assessment of stability in blood. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 21, 531-540.
- Martin, F. J. (1990). Pharmaceuticals Manufacturing of Liposomes. Dalam P. Tyle, *Specialized Drug Delivery Systems Manufacturing and Production Technology* (278-294). New York: Marcel Dekker.
- Martin, A., Swarbrick, J., dan Cammarata, A. (1990). *Farmasi Fisika: Dasar-Dasar Kimia Fisik dalam Ilmu Farmasetik*, jilid 2 (ed. III), (Yoshita, Penerjemah). Jakarta: UI Press.
- Moffat, A. C., Osselton, D., dan Brian, W. (2005). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, editor: Laurent Y Galichet. London: Pharmaceutical Press.
- Mui, B., dan Hope, M. (2007). Formation of large unilamellar vesicles by extrusion. Dalam G. Gregoriadis, *Liposome Technology Third Edition Volume I*. New York: Informa Healthcare.
- O'Neil, M. J., *et al.* (2001). *The Merck Index 13th Ed.* New Jearsey: Merck dan Co., Inc. Whitehouse Station.
- Palankar, R., Ramaye, Y., Fournier, D., dan Winterhalter, M. (2008). Functionalized Liposomes. Dalam Liu, A. Leitmannova, *Advances in Planar lipid Bilayer and Liposomes* (First ed., Vol 7, hal 41-42). USA: Elsevier.
- Phoeung, Thida., Aubron, Pauline., Rydzek, Gauthier., dan Lafleur, Michel. (2010). pH-Triggered release from nanophospholipid LUVs Modulated by the pKa of the included fatty acid. *Langmuir Article*, 26 (15), 12769-12776.
- Pignatello, R., Musumeci, T., Basile, L., Carbone, C., dan Puglisi, G. (2011). Biomembrane models and drug-biomembrane interaction studies:

- Involvement in drug design and development. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, 3 (1), 4-14.
- Reimer, L., dan Kohl, H. (2008) . *Transmission Electron Microscopy : Physics of Image Formation*. USA : Springer Science and Business Media.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., dan Quinn, M. E. (Eds). (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Sixth ed, 178-180, 385-387, 473-474). USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association.
- Riaz, M. (1996). Review: Liposomes preparation methods. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19 (1), 65-77.
- Se, Y. A., *et al.* (2009). Preparation of monodisperse and size-controlled poly(ethylene glycol) hydrogel nanoparticles using liposom templates. *Journal of Colloid and Interface Science*, 98-10.
- Setiabudy, R. (Ed.). (2007). *Farmakologi dan Terapi edisi 5*. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 724.
- Schroeder, A., Kost, J., dan 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.
- Schweitzer, Jim. (2010). *Scanning Electron Microscope*. Purdue University, radiological and Enviromental Management.  
<http://www.purdue.edu/rem/rs/sem.htm>
- Sudimack, Jennifer J., Guo, Wenjin., Tjarks, Werner., dan Lee, Robert J. (2002). A novel pH-snsitive liposome formulation containing oleyl alcohol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1564, 31-37.
- Swarbrick, J. (2007). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Informa Healthcare USA.
- Thomas, A. M., *et al.* (2011). Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy. *Journal of Control Release*, 150, 21-219.
- Torchilin, V. P., Lukyanov, A. N., Klibanov, A. L., dan Omelyanenko, V. G. (1992). Interaction between oleic acid-containing pH-sensitive and plain liposomes. *Journal of FEBS (Federation of European Biochemical Societies)*, 305 (3), 185-188.
- Ulrich, A. S. (2002). Overview: Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports*, 22 (2), 129-134.

Wu, J., Zhao, X., dan 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..





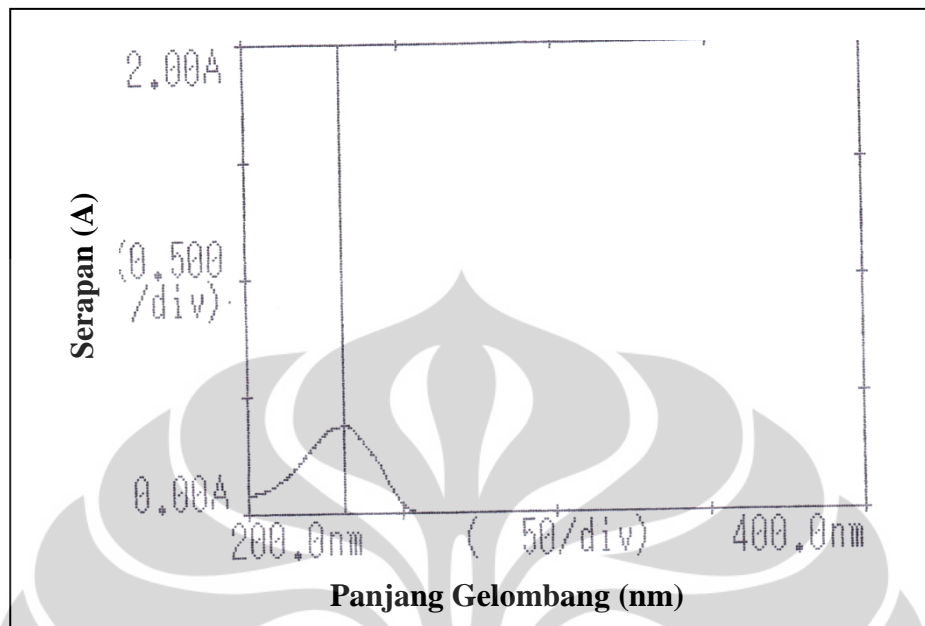
**Lampiran 1.** Lapis tipis yang terbentuk di dalam permukaan labu bulat



**Lampiran 2.** Hasil hidrasi lapis tipis dalam labu bulat

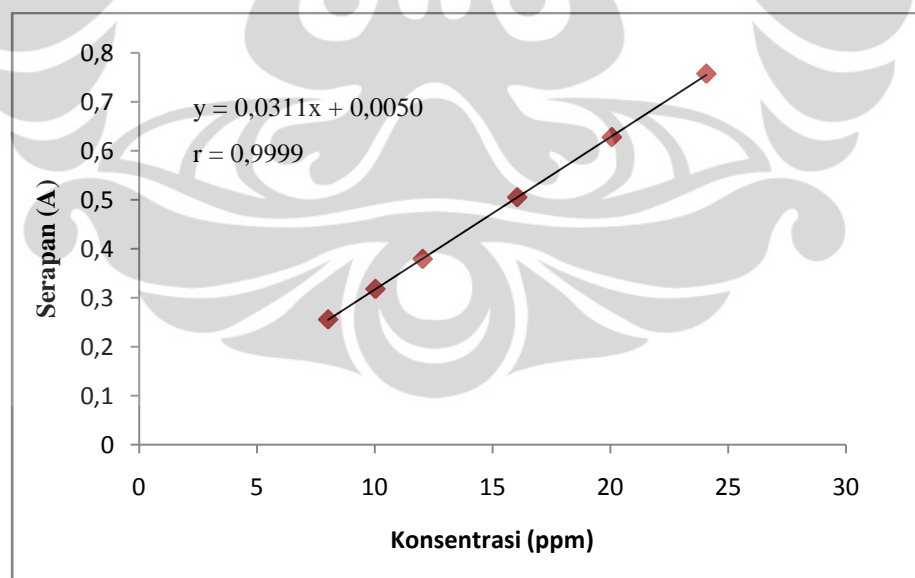


**Lampiran 3.** Spektrum serapan spiramisin dalam medium dapar fosfat pH 7,4



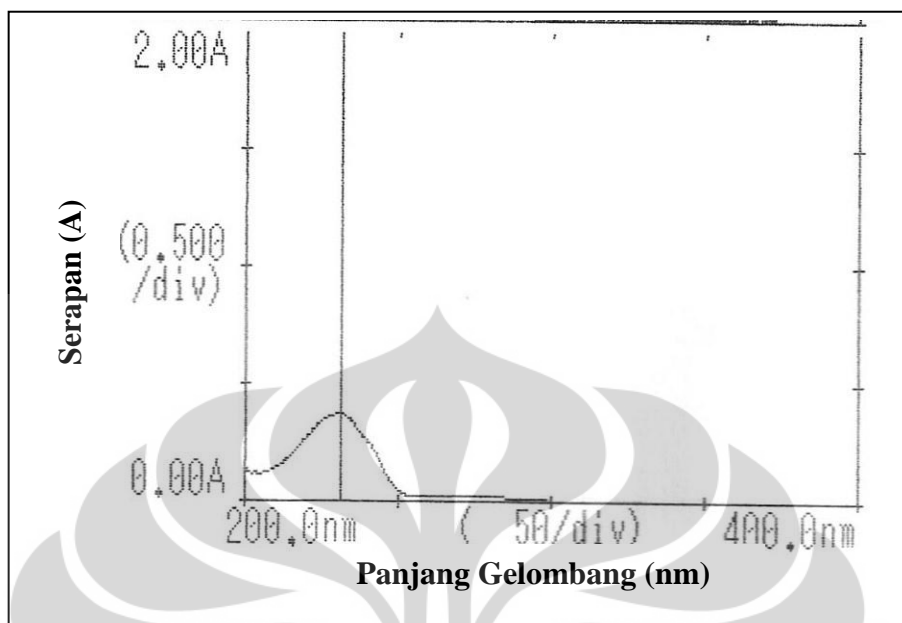
Keterangan : Spektrum serapan spiramisin konsentrasi 12,036 ppm dalam medium dapar fosfat pH 7,4 pada panjang gelombang maksimum 231,5 nm

**Lampiran 4.** Kurva kalibrasi spiramisin dalam medium dapar fosfat pH 7,4



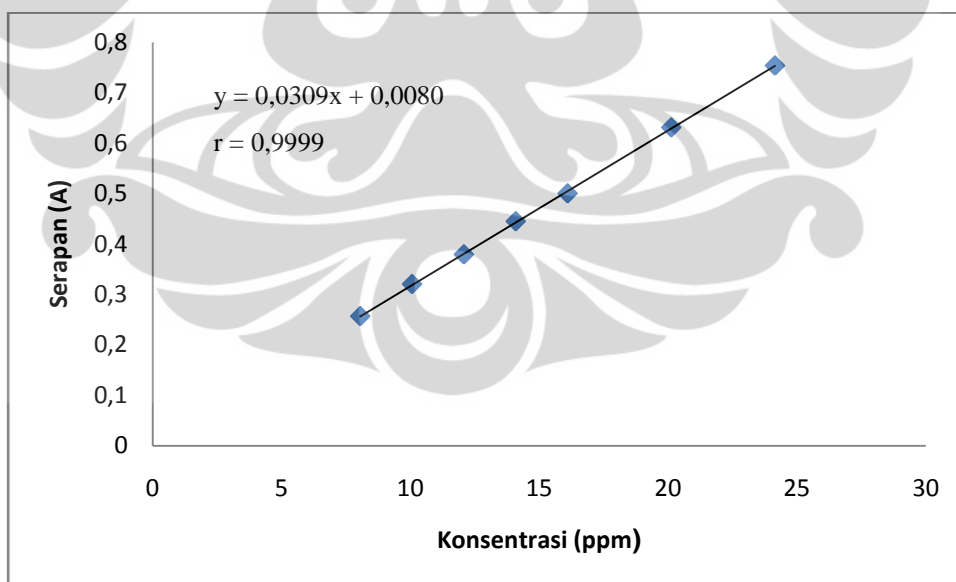
Keterangan : Serapan diperoleh pada panjang gelombang maksimum 231,5 nm

### Lampiran 5. Spektrum serapan spiramisin dalam metanol



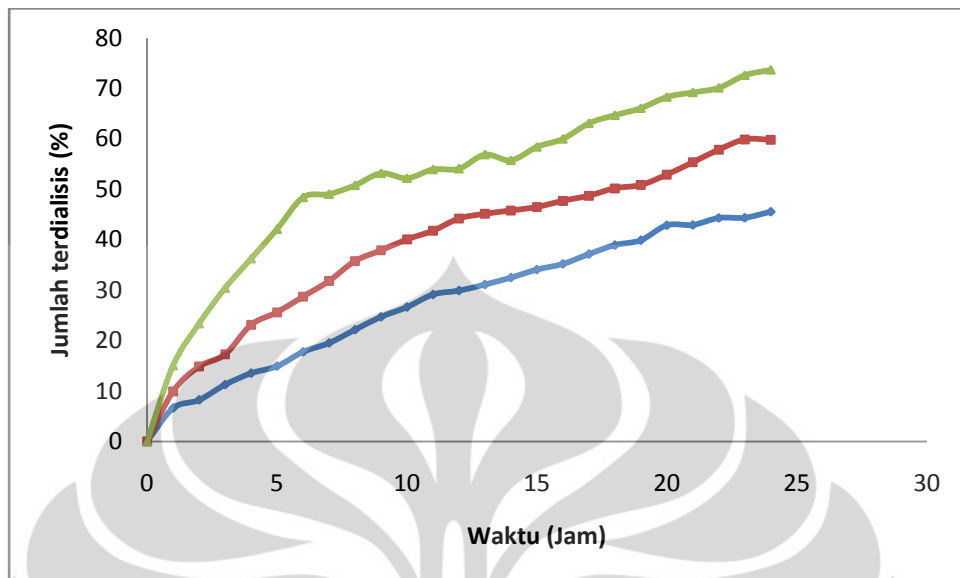
Keterangan : Spektrum serapan spiramisin konsentrasi 12,072 ppm dalam metanol, pada panjang gelombang maksimum 231,5 nm

### Lampiran 6. Kurva kalibrasi spiramisin dalam metanol



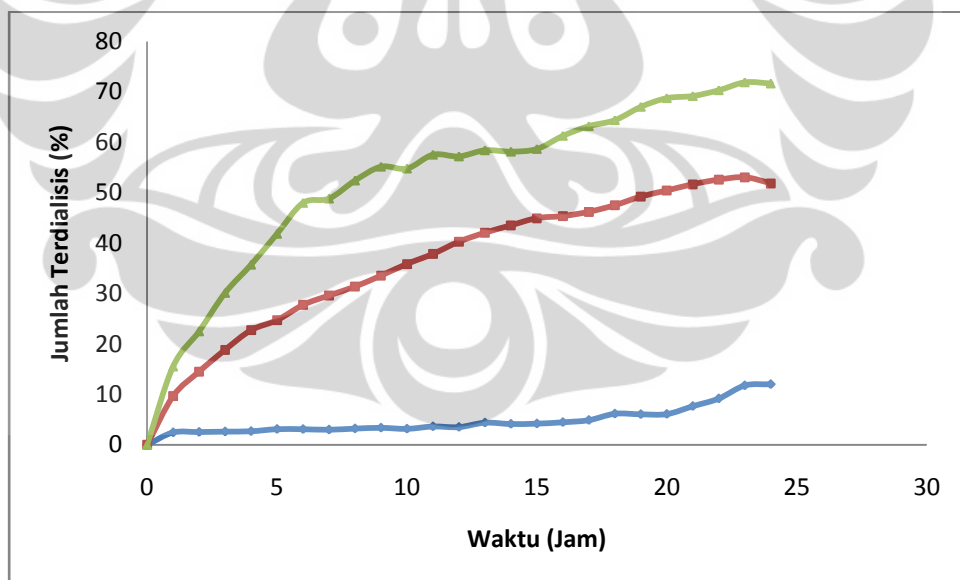
Keterangan : Serapan diperoleh pada panjang gelombang maksimum 231,5 nm

**Lampiran 7.** Grafik persentase dialisis spiramisin dalam formula 1



Keterangan : (Biru) tanpa ekstrusi, (Merah), ekstrusi 0,4  $\mu\text{m}$ , (Hijau) ekstrusi 0,2  $\mu\text{m}$

**Lampiran 8.** Grafik persentase dialisis spiramisin dalam formula 2

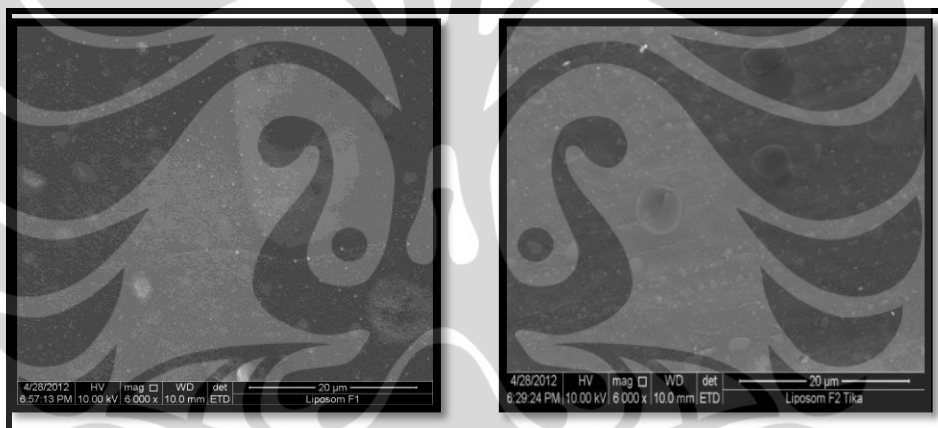


Keterangan : (Biru) tanpa ekstrusi, (Merah), ekstrusi 0,4  $\mu\text{m}$ , (Hijau) ekstrusi 0,2  $\mu\text{m}$

**Lampiran 9.** Suspensi liposom yang dihasilkan dari Formula 1 dan Formula 2

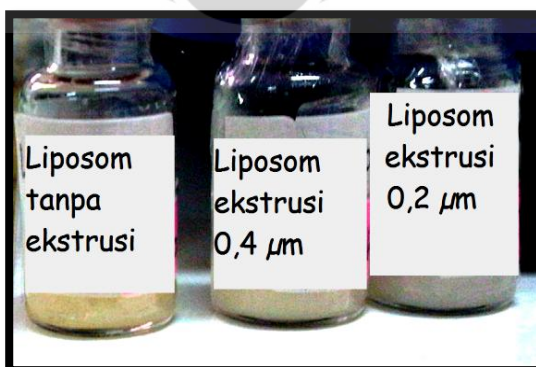


**Lampiran 10.** Bentuk dan morfologi liposom F1 dan F2 tanpa ekstrusi dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM) perbesaran 6000x

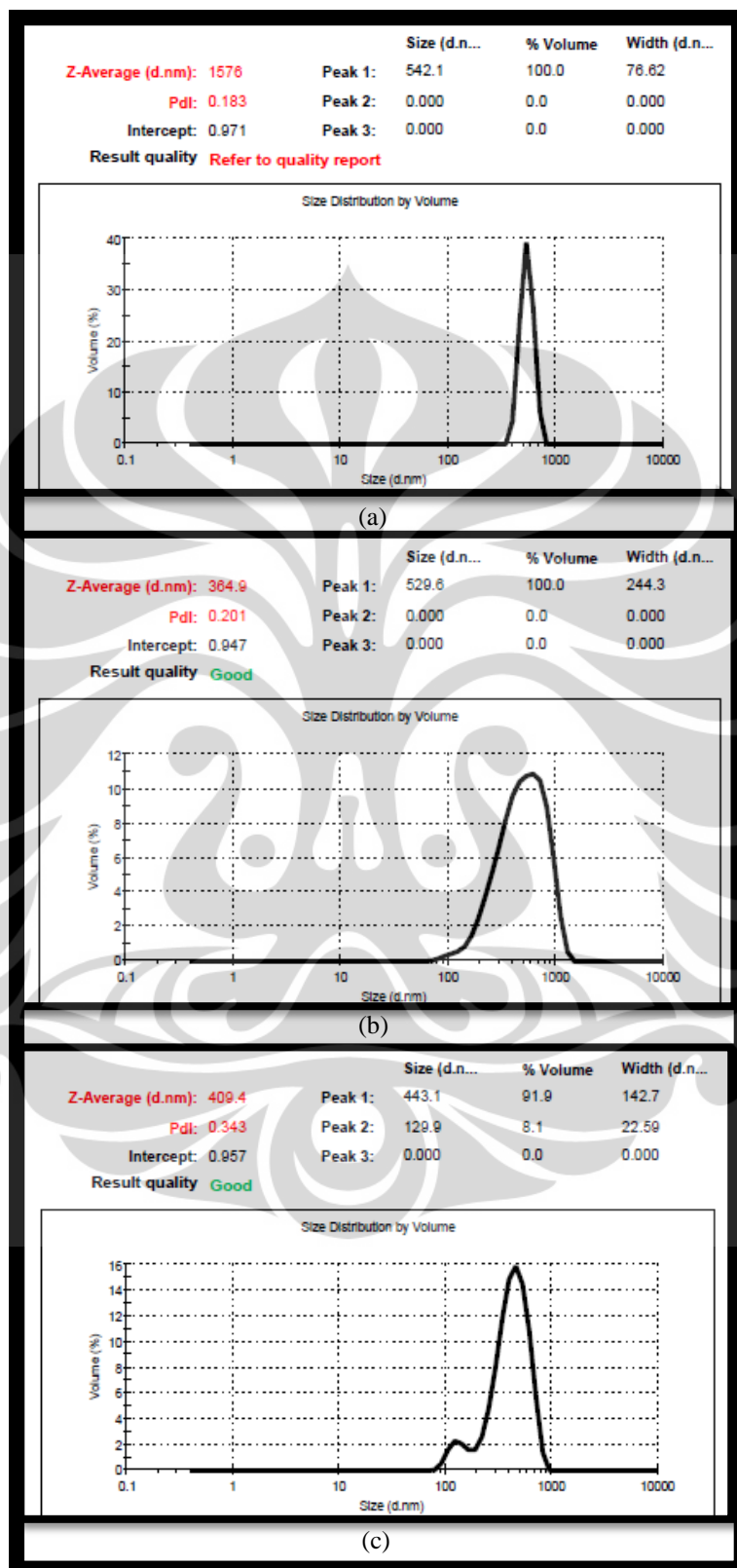


Keterangan : (kiri) formula 1 dan (kanan) formula 2

**Lampiran 11.** Pengamatan warna liposom sebelum dan sesudah ekstrusi

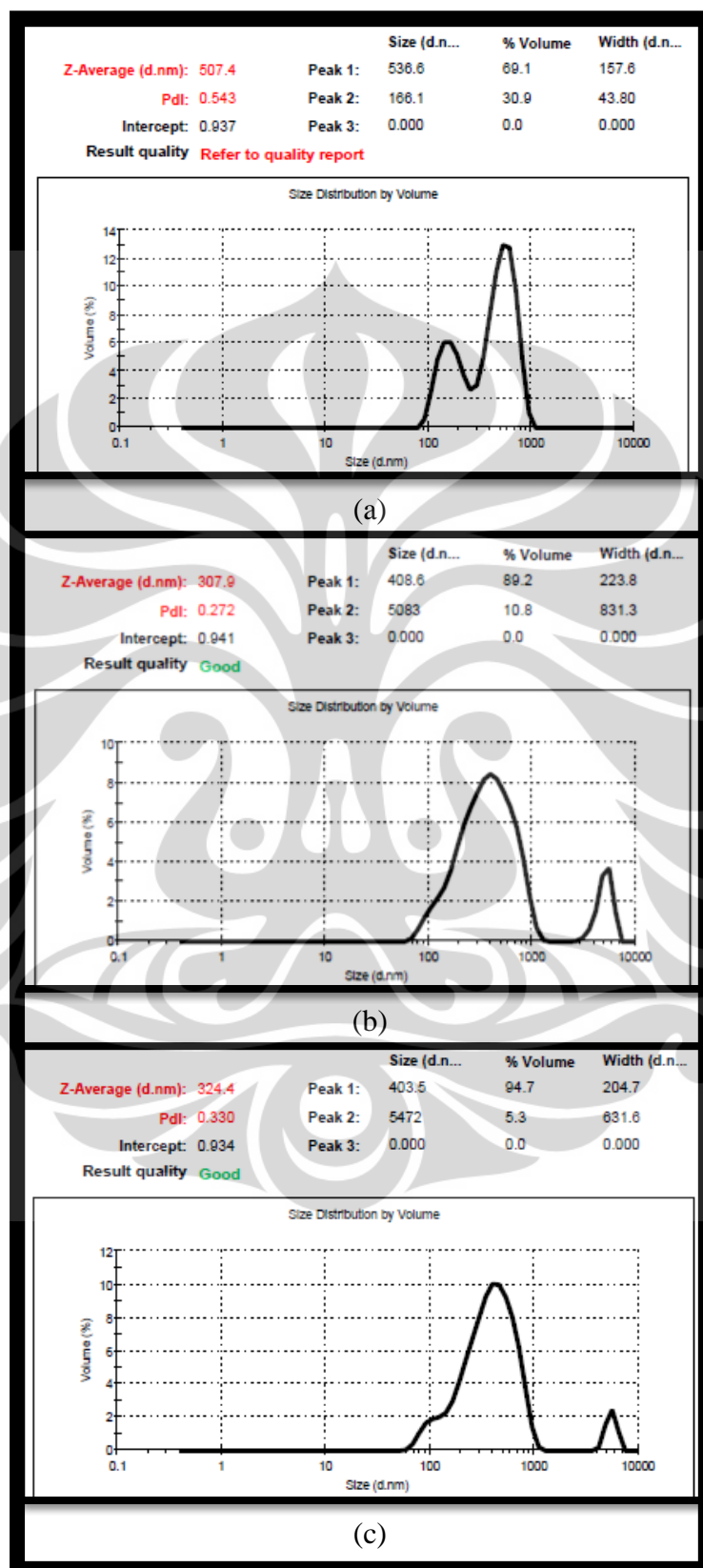


**Lampiran 12.** Hasil pengukuran distribusi ukuran partikel liposom F1 dengan *Particle Size Analyzer*.



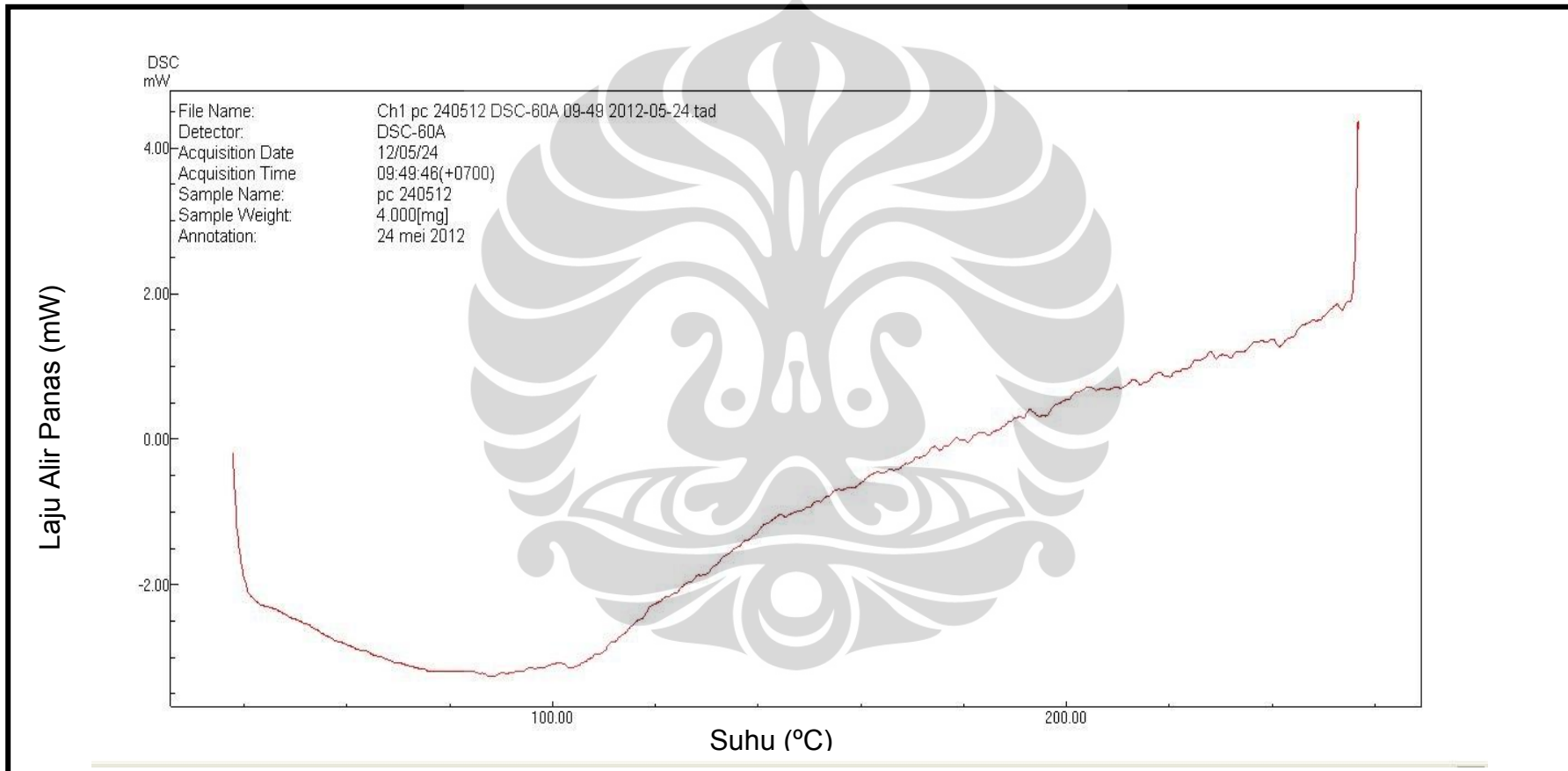
Keterangan : (a) sebelum diekstrusi (b) ekstrusi membran 0,4  $\mu\text{m}$  (c) ekstrusi membran 0,2  $\mu\text{m}$ .

**Lampiran 13.** Hasil pengukuran distribusi ukuran partikel liposom F2 dengan *Particle Size Analyzer*.



Keterangan : (a) sebelum diekstrusi (b) ekstrusi membran 0,4  $\mu\text{m}$  (c) ekstrusi membran 0,2  $\mu\text{m}$ .

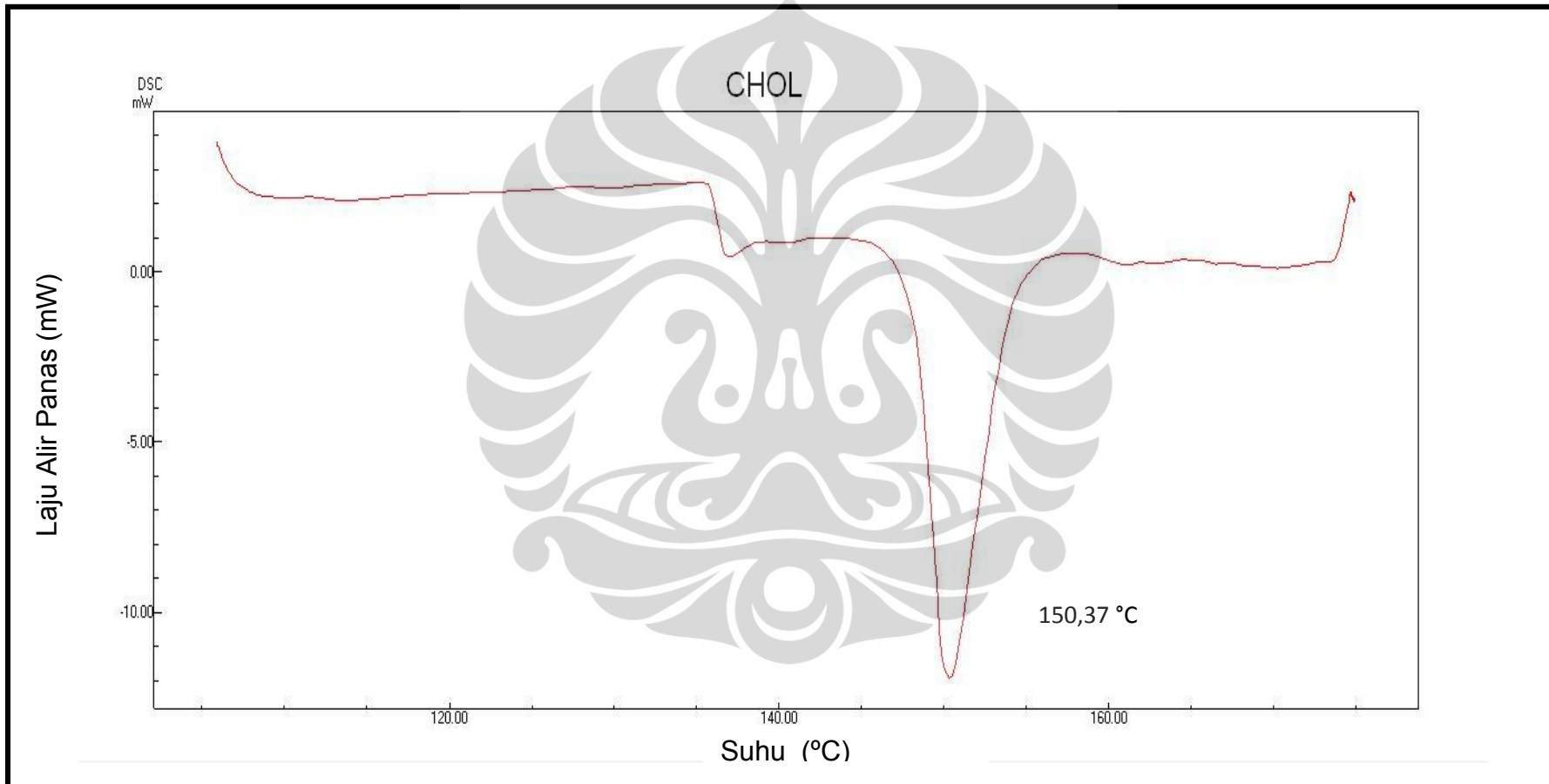
#### Lampiran 14. Termogram lesitin/fosfatidilkolin dengan DSC



Keterangan: Analisis dilakukan dengan detektor DSC-60A, laju alir 10°C/menit, laju alir gas nitrogen 30 ml/menit, bobot 4,000 mg, tidak ditemukan suatu puncak endotermik sehingga tidak dapat teridentifikasi.

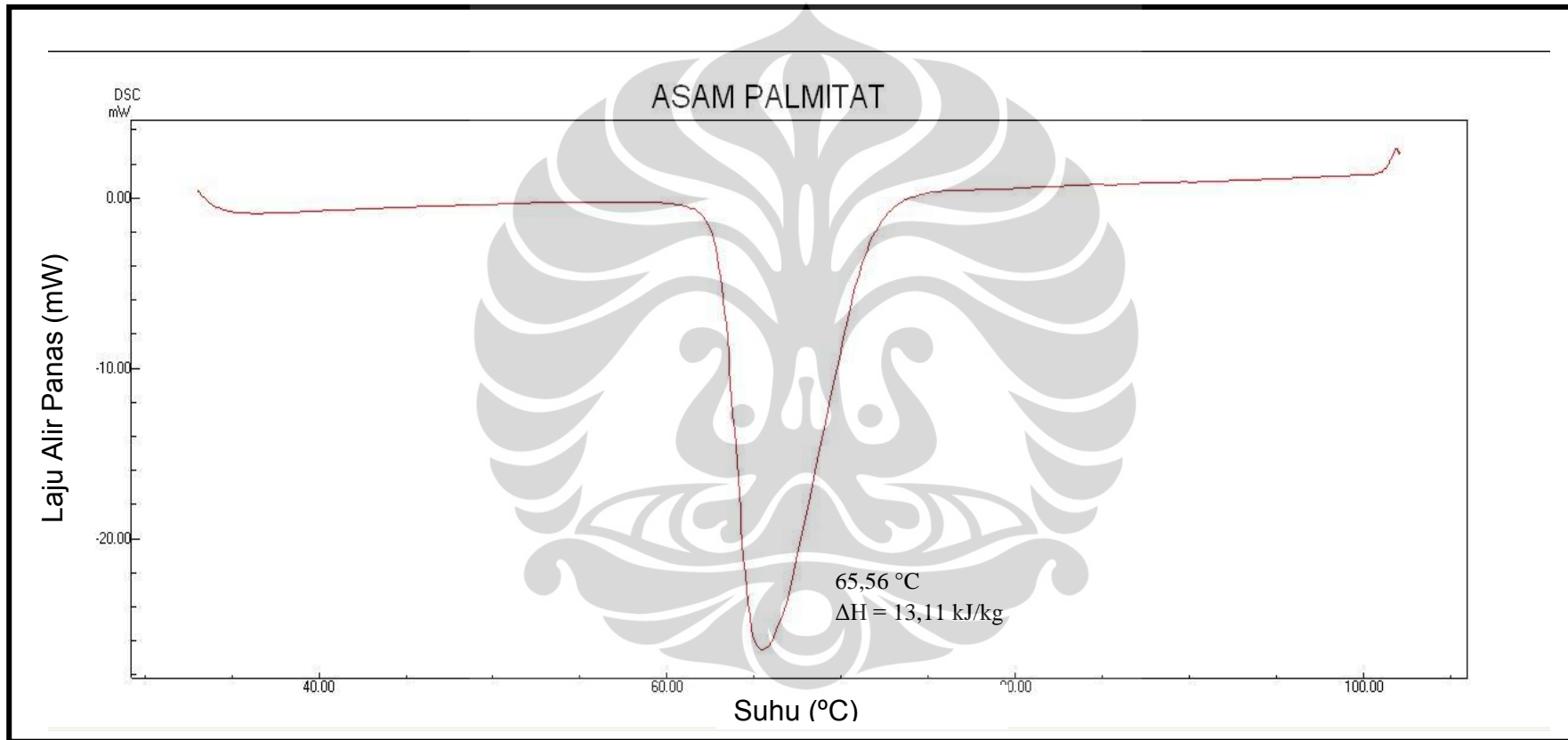


**Lampiran 15.** Termogram kolesterol dengan DSC



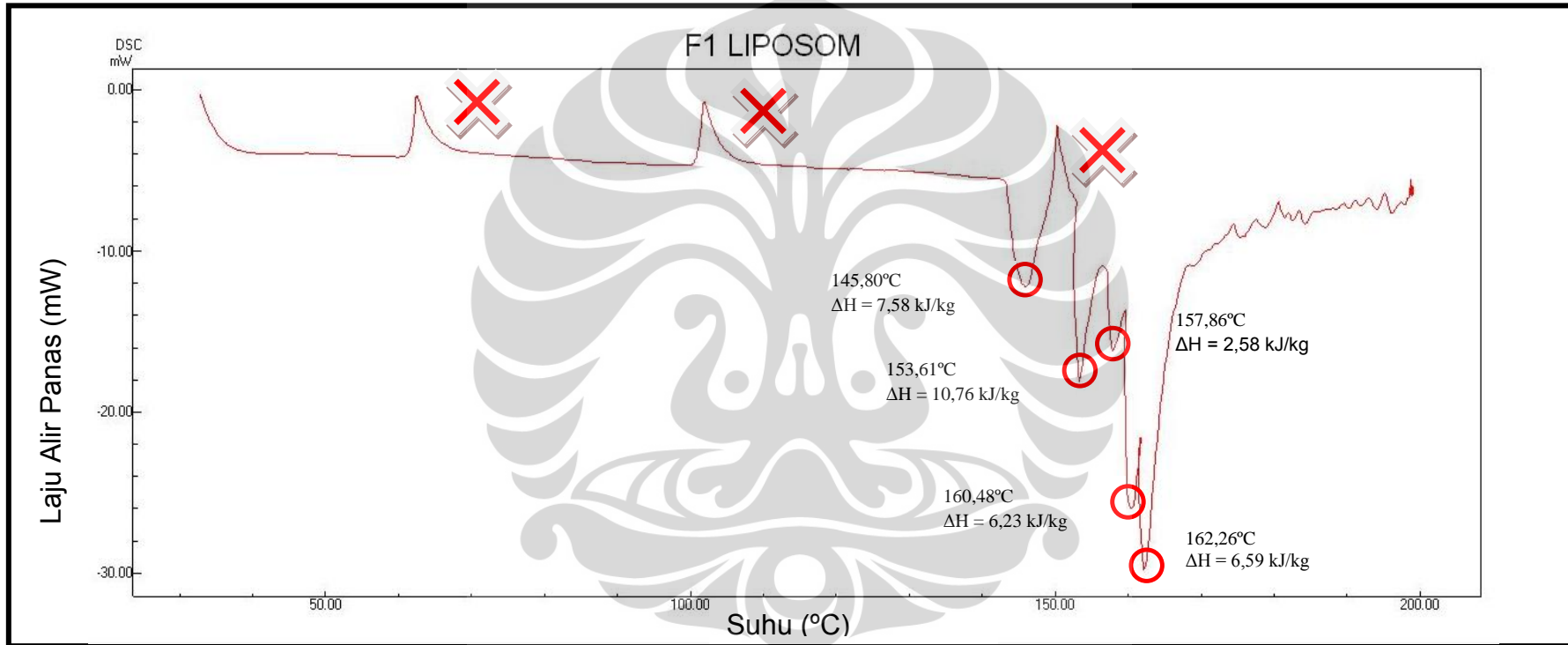
Keterangan: Analisis dilakukan dengan detektor DSC-60A, laju alir 10°C/menit, laju alir gas nitrogen 30 ml/menit, bobot 4,000 mg, menunjukkan puncak endotermik, yaitu pada suhu 150,37°C ( $\Delta H = 67,58 \text{ kJ/kg}$ ).

**Lampiran 16.** Termogram asam palmitat dengan DSC



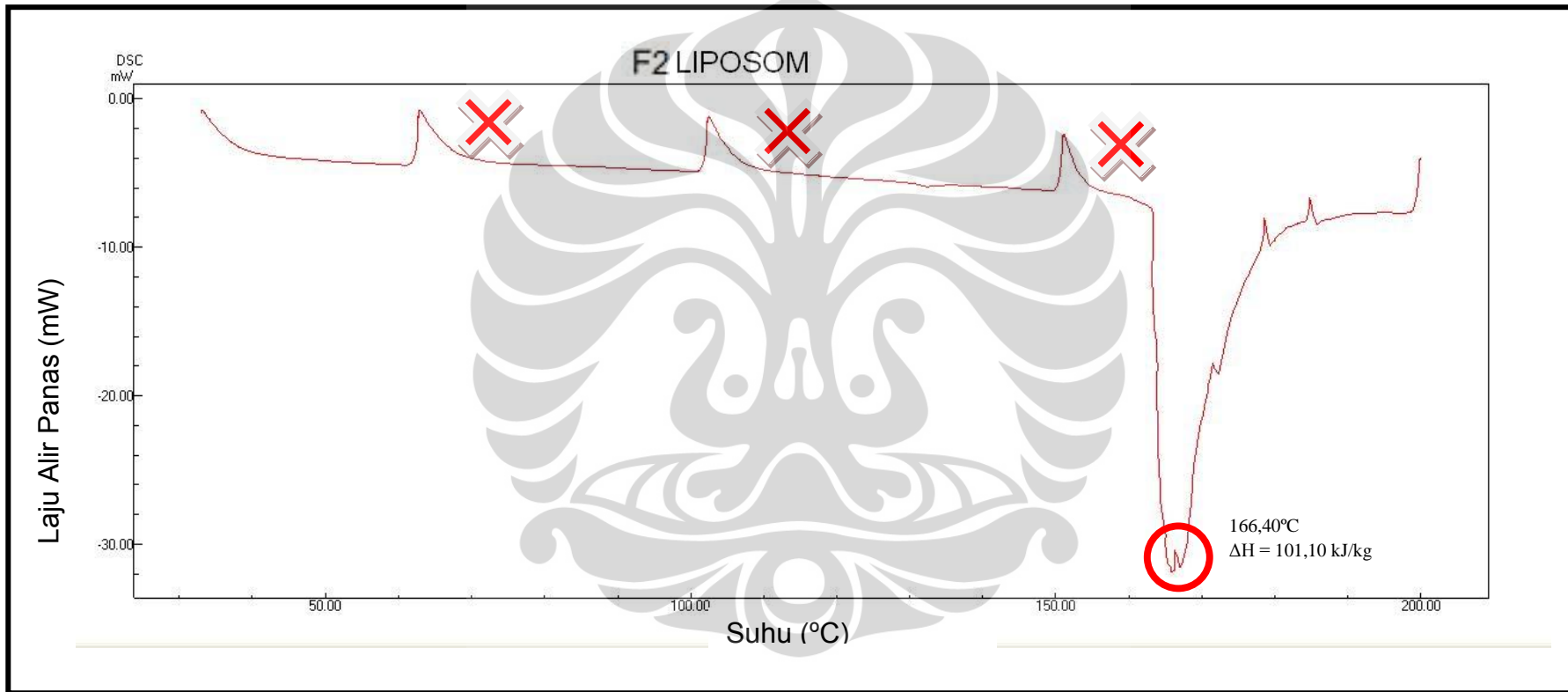
Keterangan: Analisis dilakukan dengan detektor DSC-60A, laju alir 10°C/menit, laju alir gas nitrogen 30 ml/menit, bobot 4,000 mg, menunjukkan puncak endotermik, yaitu pada suhu 65,56°C ( $\Delta H = 13,11$  kJ/kg ).

**Lampiran 17.** Termogram campuran lipid formula 1 dengan DSC



Keterangan: Analisis dilakukan dengan detektor DSC-60A, laju alir 10°C/menit, laju alir gas nitrogen 30 ml/menit, bobot 4,000 mg, menunjukkan beberapa puncak endotermik, yaitu pada suhu 145,80°C ( $\Delta H = 7,58$  kJ/kg), 153,61°C ( $\Delta H = 10,76$  kJ/kg), 157,86°C ( $\Delta H = 2,58$  kJ/kg), 160,48°C ( $\Delta H = 6,23$  kJ/kg), dan 162,26°C ( $\Delta H = 6,59$  kJ/kg).

**Lampiran 18.** Termogram campuran lipid formula 2 dengan DSC



Keterangan: Analisis dilakukan dengan detektor DSC-60A, laju alir 10°C/menit, laju alir gas nitrogen 30 ml/menit, bobot 4,000 mg, menunjukkan puncak endotermik, yaitu pada suhu 166,40°C ( $\Delta H = 101,10 \text{ kJ/kg}$ ).

**Lampiran 19.** Data konsentrasi dan serapan kurva kalibrasi spiramisin dalam larutan dapar fosfat pH 7,4

Konsentrasi (ppm)	Serapan (A)
8,024	0,2559
10,030	0,3181
12,036	0,3793
16,048	0,5052
20,060	0,6278
24,072	0,7572

$$y = 0,0311x + 0,0050$$

$$r = 0,9999$$

**Lampiran 20.** Data konsentrasi dan serapan kurva kalibrasi spiramisin dalam metanol

Konsentrasi (ppm)	Serapan (A)
8,048	0,2567
10,060	0,3203
12,072	0,3792
14,084	0,4449
16,096	0,5002
20,120	0,6311
24,144	0,7538

$$y = 0,0309x + 0,0080$$

$$r = 0,9999$$

**Lampiran 21.** Tabel data hasil dialisis formula 1 sebelum ekstrusi (percobaan ke-1)

Waktu (jam)	Serapan (A)	$W_n$ (Berat Kumulatif) (mg)	Jumlah Terdialisis (%)
0	-	-	0
0,25	0,0723	0,2171	2,68
0,5	0,1172	0,3747	4,67
0,75	0,0784	0,2855	3,56
1	0,1488	0,5345	6,67
2	0,1697	0,6471	8,07
3	0,2697	1,0205	12,73
4	0,3325	1,3065	16,30
5	0,3325	1,4110	17,60
6	0,4084	1,7593	21,95
7	0,4084	1,8882	23,56
8	0,4598	2,1822	27,22
9	0,5052	2,4734	30,86
10	0,5032	2,6269	32,77
11	0,5025	2,7840	34,73
12	0,4873	2,8943	36,11
13	0,4551	2,9451	36,74
14	0,4751	3,1532	39,34
15	0,4416	3,1960	39,87
16	0,4114	3,2385	40,40
17	0,4052	3,3485	41,77
18	0,3979	3,4529	43,08
19	0,3845	3,5354	44,10
20	0,3476	3,5381	44,13
21	0,2965	3,4834	43,45
22	0,2836	3,5349	44,09
23	0,2606	3,5498	44,28
24	0,2596	3,6281	45,26

**Lampiran 22.** Tabel data hasil dialisis formula 1 sebelum ekstrusi (percobaan ke-2)

Waktu (jam)	Serapan (A)	$W_n$ (Berat Kumulatif) (mg)	Jumlah Terdialisis (%)
0	-	-	0
0,25	0,061	0,1733	2,16
0,5	0,0802	0,2523	3,15
0,75	0,1152	0,3882	4,84
1	0,1469	0,5247	6,55
2	0,1784	0,6708	8,37
3	0,1963	0,7833	9,77
4	0,2018	0,8617	10,75
5	0,2192	0,9801	12,23
6	0,2316	1,0881	13,57
7	0,2564	1,2399	15,47
8	0,2714	1,3681	17,07
9	0,2818	1,4864	18,54
10	0,3032	1,6434	20,50
11	0,3491	1,8859	23,53
12	0,3193	1,9000	23,70
13	0,3326	2,0430	25,49
14	0,3036	2,0544	25,63
15	0,3401	2,2669	28,28
16	0,3493	2,4034	29,98
17	0,3784	2,6067	32,52
18	0,3978	2,7883	34,78
19	0,3815	2,8614	35,70
20	0,4913	3,3343	41,60
21	0,4131	3,2387	40,40
22	0,4254	3,4086	42,52
23	0,4309	3,5606	44,42
24	0,4236	3,6733	45,82

**Lampiran 23.** Tabel data hasil dialisis formula 1 ekstrusi 0,4  $\mu\text{m}$  (percobaan ke-1)

Waktu (jam)	Serapan (A)	$W_n$ (Berat Kumulatif) (mg)	Jumlah Terdialisis (%)
0	-	-	0
0,25	0,0291	0,0708	0,87
0,5	0,0612	0,1775	2,19
0,75	0,0754	0,2318	2,86
1	0,0935	0,3009	3,72
2	0,1871	0,6153	7,60
3	0,1800	0,6214	7,68
4	0,3624	1,2350	15,25
5	0,3906	1,3826	17,08
6	0,4453	1,6198	20,01
7	0,5063	1,7353	21,43
8	0,5623	2,1461	26,51
9	0,6050	2,3724	29,30
10	0,6421	2,5876	31,96
11	0,6836	2,8228	34,87
12	0,6956	2,4218	29,91
13	0,7184	3,1538	38,95
14	0,7415	3,3422	41,28
15	0,7491	3,4842	43,04
16	0,7790	3,6997	45,70
17	0,7897	3,8580	47,65
18	0,8220	4,0874	50,49
19	0,7901	4,1155	50,83
20	0,7773	4,2004	51,88
21	0,8002	4,3976	54,32
22	0,7898	4,4916	55,48
23	0,7632	4,5318	55,98
24	0,8365	4,8887	60,38



**Lampiran 24.** Tabel data hasil dialisis formula 1 ekstrusi 0,4  $\mu\text{m}$  (percobaan ke-2)

Waktu (jam)	Serapan (A)	$W_n$ (Berat Kumulatif) (mg)	Jumlah Terdialisis (%)
0	-	-	0
0,25	0,2716	0,0708	0,87
0,5	0,3028	1,0348	12,78
0,75	0,3145	1,1673	14,42
1	0,3265	1,3046	16,11
2	0,4457	1,7900	22,11
3	0,5211	2,1730	26,84
4	0,5741	2,5083	30,98
5	0,5973	2,7649	34,15
6	0,6215	3,0322	37,45
7	0,6986	2,6078	32,21
8	0,6825	3,6475	45,05
9	0,6507	3,7623	46,47
10	0,6289	3,8989	48,16
11	0,5808	3,9442	48,72
12	0,5556	2,1456	26,50
13	0,5345	4,1559	51,33
14	0,4561	4,0735	50,32
15	0,4022	4,0446	49,96
16	0,3574	4,0277	49,75
17	0,324	4,0329	49,81
18	0,2949	4,0413	49,92
19	0,2904	4,1193	50,88
20	0,3397	4,3686	53,96
21	0,3177	4,4048	54,41
22	0,3336	4,5556	56,27
23	0,3395	4,6794	57,80
24	0,3433	4,7984	59,27

**Lampiran 25.** Tabel data hasil dialisis formula 1 ekstrusi 0,2  $\mu\text{m}$  (percobaan ke-1)

Waktu (jam)	Serapan (A)	$W_n$ (Berat Kumulatif) (mg)	Jumlah Terdialisis (%)
0	-	-	0
0,25	0,0554	0,1553	1,92
0,5	0,1223	0,3857	4,76
0,75	0,2204	0,7377	9,11
1	0,3601	1,2549	15,50
2	0,5007	1,8198	22,48
3	0,6436	2,4372	30,10
4	0,7209	2,8899	35,70
5	0,804	3,3860	41,82
6	0,879	3,8828	47,96
7	0,8132	3,9515	48,81
8	0,8229	4,2415	52,39
9	0,8609	4,6256	57,13
10	0,7158	4,4338	54,77
11	0,7142	4,6563	57,51
12	0,6349	4,6287	57,17
13	0,6531	4,8888	60,39
14	0,5061	4,6242	57,12
15	0,4947	4,7478	58,64
16	0,5116	4,9587	61,25
17	0,5096	5,1143	63,17
18	0,4893	5,2105	64,36
19	0,5078	5,4248	67,01
20	0,501	5,5638	68,72
21	0,4623	5,5981	69,15
22	0,4203	5,6095	69,29
23	0,4438	5,8176	71,86
24	0,4699	6,0417	74,63

**Lampiran 26.** Tabel data hasil dialisis formula 1 ekstrusi 0,2  $\mu\text{m}$  (percobaan ke-2)

Waktu (jam)	Serapan (A)	$W_n$ (Berat Kumulatif) (mg)	Jumlah Terdialisis (%)
0	-	-	0
0,25	0,0764	0,2227	2,75
0,5	0,1365	0,4380	5,41
0,75	0,2093	0,7134	8,81
1	0,3351	1,1823	14,60
2	0,5461	1,9653	24,27
3	0,6551	2,4884	30,74
4	0,7439	2,9817	36,83
5	0,8106	3,4326	42,40
6	0,8935	3,9568	48,87
7	0,8162	3,9933	49,32
8	0,7329	3,9856	49,23
9	0,6609	3,9875	49,25
10	0,6058	4,0205	49,66
11	0,5642	4,0792	50,39
12	0,5249	4,1319	51,04
13	0,5331	4,3246	53,42
14	0,5061	4,4068	54,43
15	0,5513	4,7122	58,20
16	0,5116	4,7595	58,79
17	0,5686	5,1046	63,05
18	0,5634	5,2682	65,07
19	0,5113	5,2796	65,21
20	0,4792	5,3385	65,94
21	0,4162	5,2878	65,31
22	0,3165	5,0990	62,98
23	0,4983	5,7822	71,42
24	0,4835	5,8924	72,78

**Lampiran 27.** Tabel data hasil dialisis formula 2 sebelum ekstrusi (percobaan ke-1)

Waktu (jam)	Serapan (A)	$W_n$ (Berat Kumulatif) (mg)	Jumlah Terdialisis (%)
0	-	-	0
0,25	0,0356	0,0917	1,14
0,5	0,0376	0,1027	1,28
0,75	0,043	0,1250	1,56
1	0,0358	0,1076	1,34
2	0,04	0,1257	1,57
3	0,0425	0,1390	1,73
4	0,0415	0,1415	1,77
5	0,048	0,1679	2,09
6	0,0455	0,1665	2,08
7	0,0492	0,1481	1,85
8	0,0531	0,2038	2,54
9	0,0532	0,2115	2,64
10	0,0452	0,1933	2,41
11	0,0488	0,2110	2,63
12	0,0609	0,1858	2,32
13	0,0798	0,3259	4,07
14	0,0696	0,3048	3,80
15	0,0651	0,3004	3,75
16	0,0826	0,3659	4,56
17	0,1057	0,4522	5,64
18	0,1594	0,6405	7,99
19	0,1475	0,6268	7,82
20	0,1515	0,6622	8,26
21	0,1777	0,7695	9,60
22	0,1942	0,8499	10,60
23	0,2051	0,9149	11,41
24	0,1974	0,9220	11,50

**Lampiran 28.** Tabel data hasil dialisis formula 2 sebelum ekstrusi (percobaan ke-2)

Waktu (jam)	Serapan (A)	$W_n$ (Berat Kumulatif) (mg)	Jumlah Terdialisis (%)
0	-	-	0
0,25	0,0853	0,2096	2,61
0,5	0,0819	0,2655	3,31
0,75	0,0736	0,2629	3,28
1	0,0741	0,2859	3,57
2	0,0659	0,2811	3,51
3	0,0603	0,2820	3,52
4	0,0576	0,2904	3,62
5	0,0651	0,3308	4,13
6	0,0592	0,3305	4,12
7	0,0547	0,3328	4,15
8	0,0437	0,3127	3,90
9	0,0453	0,3296	4,11
10	0,0372	0,3159	3,94
11	0,0516	0,3718	4,64
12	0,0492	0,3784	4,72
13	0,0449	0,3782	4,72
14	0,0348	0,3579	4,46
15	0,037	0,3739	4,66
16	0,0271	0,3517	4,39
17	0,0193	0,3331	4,16
18	0,0229	0,3486	4,35
19	0,0201	0,3447	4,30
20	0,0099	0,3161	3,94
21	0,0544	0,4600	5,74
22	0,1003	0,6226	7,77
23	0,2003	0,9737	12,15
24	0,1908	1,0052	12,54

**Lampiran 29.** Tabel data hasil dialisis formula 2 ekstrusi 0,4  $\mu\text{m}$  (percobaan ke-1)

Waktu (jam)	Serapan (A)	$W_n$ (Berat Kumulatif) (mg)	Jumlah Terdialisis (%)
0	-	-	0
0,25	0,0723	0,2096	2,61
0,5	0,0972	0,3105	3,87
0,75	0,1084	0,3754	4,68
1	0,1188	0,4414	5,51
2	0,1397	0,5444	6,79
3	0,2197	0,8439	10,53
4	0,3025	1,1781	14,70
5	0,3325	1,3693	17,08
6	0,4084	1,7176	21,43
7	0,4084	1,8465	23,03
8	0,4598	2,1404	26,70
9	0,5052	2,4316	30,33
10	0,5032	2,5852	32,25
11	0,4925	2,7101	33,81
12	0,4973	2,8815	35,95
13	0,4951	3,0318	37,82
14	0,4951	3,1886	39,78
15	0,4816	3,3019	41,19
16	0,4114	3,2289	40,28
17	0,4252	3,4031	42,45
18	0,419	3,5175	43,88
19	0,4045	3,6032	44,95
20	0,4076	3,7408	46,67
21	0,3965	3,8338	47,83
22	0,3736	3,8853	48,47
23	0,3806	4,0255	50,22
24	<b>0,3132</b>	3,9290	49,01

**Lampiran 30.** Tabel data hasil dialisis formula 2 ekstrusi 0,4  $\mu\text{m}$  (percobaan ke-2)

Waktu (jam)	Serapan (A)	$W_n$ (Berat Kumulatif) (mg)	Jumlah Terdialisis (%)
0	-	-	0
0,25	0,1567	0,0917	1,14
0,5	0,2126	0,6842	8,53
0,75	0,3165	1,0508	13,11
1	0,3173	1,1031	13,76
2	0,5128	1,7807	22,21
3	0,6104	2,1754	27,14
4	0,6707	2,4659	30,76
5	0,6766	2,5914	32,33
6	0,686	2,7291	34,05
7	0,6932	2,4201	30,19
8	0,6672	2,8879	36,03
9	0,6527	2,9474	36,77
10	0,6879	3,1641	39,47
11	0,7146	3,3592	41,91
12	0,7516	2,6140	32,61
13	0,751	3,7092	46,27
14	0,7383	3,7879	47,25
15	0,7377	3,9034	48,69
16	0,7441	4,0413	50,41
17	0,6956	4,0039	49,95
18	0,6909	4,0993	51,14
19	0,7156	4,2884	53,50
20	0,6969	4,3422	54,17
21	0,696	4,4500	55,51
22	0,6909	4,5443	56,69
23	0,6364	4,4791	55,88
24	0,5753	4,3839	54,69

**Lampiran 31.** Tabel data hasil dialisis formula 2 ekstrusi 0,2  $\mu\text{m}$  (percobaan ke-1)

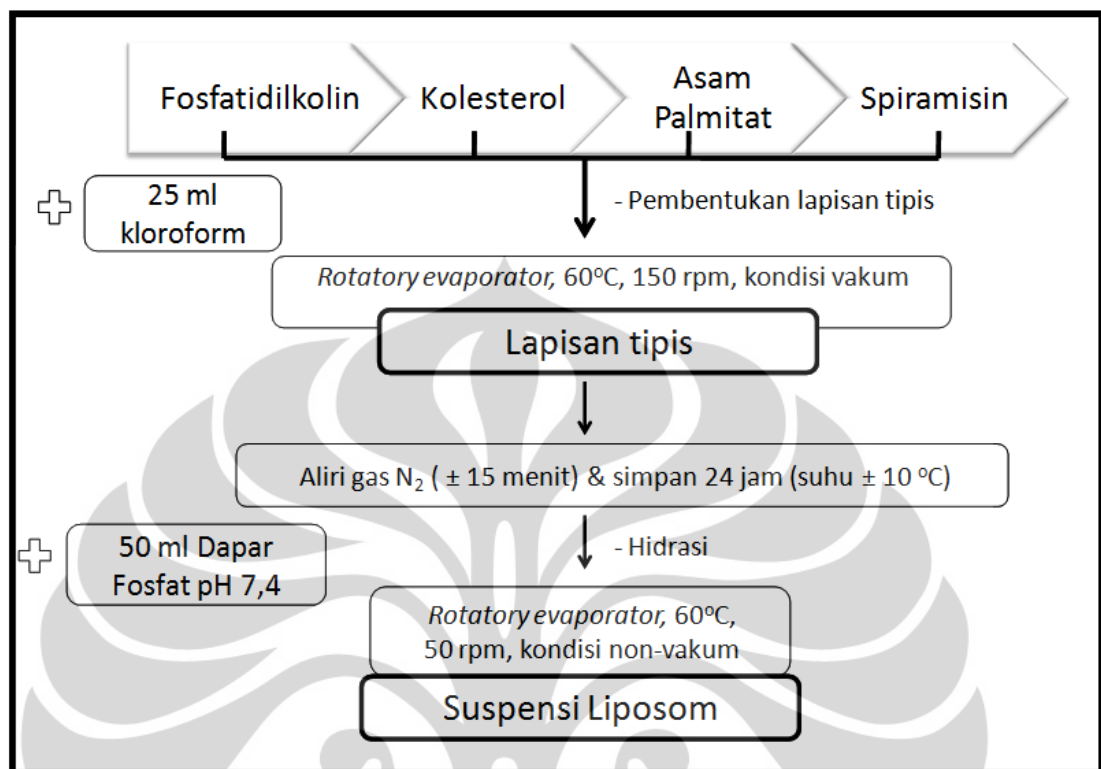
Waktu (jam)	Serapan (A)	$W_n$ (Berat Kumulatif) (mg)	Jumlah Terdialisis (%)
0	-	-	0
0,25	0,5685	0,0917	1,14
0,5	0,5663	1,8862	23,53
0,75	0,5189	1,8237	22,75
1	0,4995	1,8436	23,00
2	0,5692	2,1465	26,78
3	0,5723	2,2467	28,03
4	0,614	2,4714	30,83
5	0,6155	2,5737	32,11
6	0,6221	2,6926	33,59
7	0,5903	2,0695	25,82
8	0,5345	2,6037	32,48
9	0,4763	2,5015	31,21
10	0,4271	2,4188	30,18
11	0,3865	2,3559	29,39
12	0,3556	2,3176	28,91
13	0,3246	2,2740	28,37
14	0,3102	2,2788	28,43
15	0,394	2,5965	32,39
16	0,6014	3,3247	41,48
17	0,6832	3,6829	45,94
18	0,7015	3,8502	48,03
19	0,2191	5,1365	64,08
20	0,204	5,0643	63,18
21	0,2484	5,9354	74,04
22	0,2518	6,1837	77,14
23	0,2185	5,8455	72,92
24	0,1974	5,6765	70,81



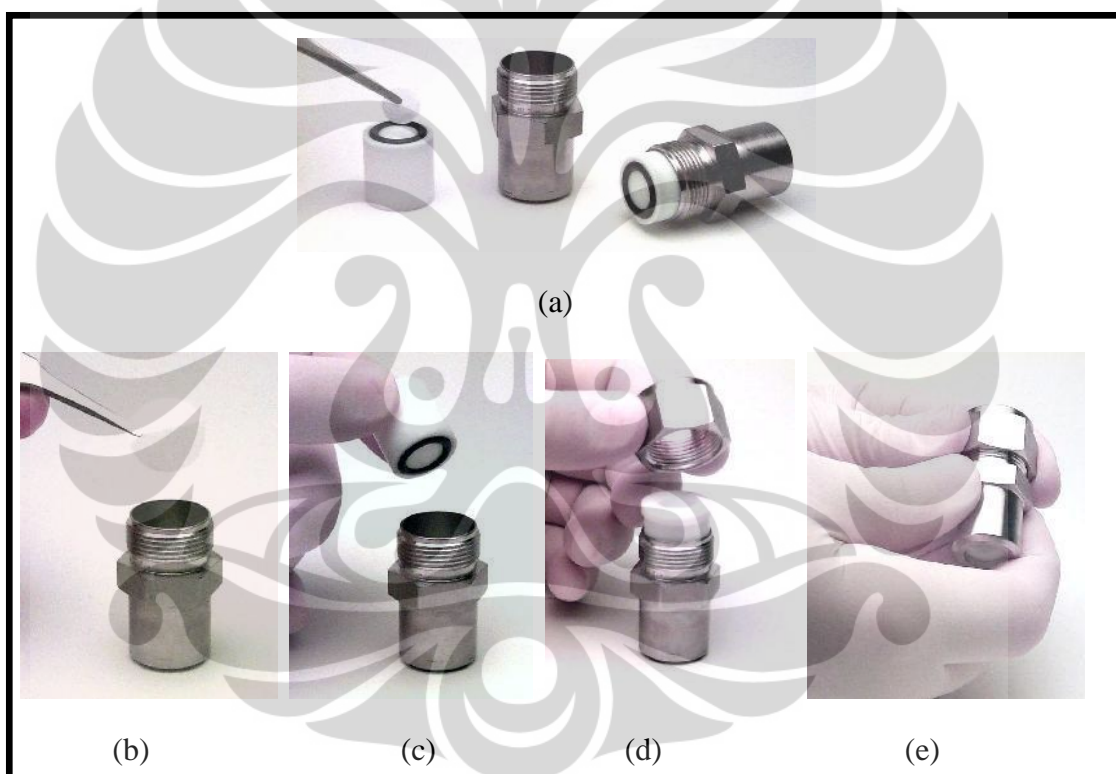
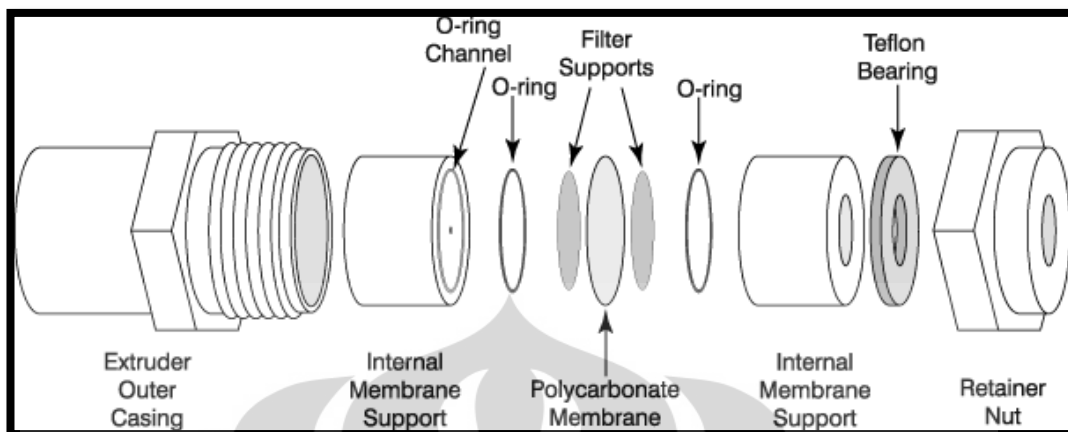
**Lampiran 32.** Tabel data hasil dialisis formula 2 ekstrusi 0,2  $\mu\text{m}$  (percobaan ke-2)

Waktu (jam)	Serapan (A)	$W_n$ (Berat Kumulatif) (mg)	Jumlah Terdialisis (%)
0	-	-	0
0,25	0,5072	1,6062	20,04
0,5	0,5283	1,7543	21,88
0,75	0,5905	2,0377	25,42
1	0,8066	2,8254	35,25
2	0,8049	2,9483	36,78
3	0,9705	3,6082	45,01
4	0,2285	4,2248	52,70
5	0,2258	4,3593	54,38
6	0,2537	4,9829	62,16
7	0,2482	4,2459	52,97
8	0,2395	5,1465	64,20
9	0,2366	5,2866	65,95
10	0,2296	5,3585	66,85
11	0,1963	5,0025	62,41
12	0,1898	5,0500	63,00
13	0,1754	4,9655	61,95
14	0,1783	5,1473	64,21
15	0,1799	5,3105	66,25
16	0,1876	5,5729	69,52
17	0,1792	5,5830	69,65
18	0,1809	5,7485	71,71
19	0,1971	6,1482	76,70
20	0,1813	6,0471	75,44
21	0,1543	5,7534	71,77
22	0,1461	5,7400	71,61
23	0,1292	5,5803	69,61
24	0,1374	5,8100	72,48

**Lampiran 33.** Skema pembuatan liposom dengan menggunakan metode hidrasi lapisan tipis



**Lampiran 34.** Skematik dan petunjuk pemasangan alat *Mini Extruder*



Keterangan: Skema rangkaian alat (atas) dan petunjuk pemasangan alat (bawah) : Tahapan pemasangan membran yang harus diperhatikan adalah (a) pemasangan *filter support*, (b) peletakkan membran, (c) pemasangan *internal membrane support*, (d) pemasangan *retainer nut*, (e) merapatkan rangkaian secukupnya.

**Lampiran 35.** Contoh perhitungan efisiensi penjerapan spiramisin oleh liposom

**Formula 1 jam ke-0,25**

Hasil pengukuran serapan (A) 0,0723 dimasukkan ke dalam rumus:

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

Persamaan kurva kalibrasi,  $y = 0,0311x + 0,0050$

Maka didapat:

$$Wt = \frac{(0,0723 - 0,0050) \times 100}{0,0311 \times 1000} = 0,2171 \text{ mg}$$

✓ Pada jam ke – 24 didapat berat akumulatif: 3,6281 mg

Konsentrasi Spiramisin di dalam vial dialisis (2 ml sampel):

$$\frac{3,6281 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = 1,814 \text{ mg/ml}$$

Konsentrasi total di dalam 50 ml suspensi liposom, penimbangan 202,4 mg:

$$\frac{202,4 \text{ mg}}{50 \text{ ml}} = 4,048 \text{ mg/ml}$$

Maka didapat efisiensi penjerapan:

$$\checkmark \frac{4,048 - 1,814}{4,048} \times 100\% = 55,19 \%$$

Efisiensi juga dapat diperoleh dari hasil pengurangan dengan persentase akumulatif spiramisin yang terdialisis selama 24 jam.

Persentase terdialisis:

$$\frac{1,814}{4,048} \times 100\% = 44,81\%$$

$$100\% - 44,81\% = 55,19\%$$

**Lampiran 36.** Contoh perhitungan jumlah spiramisin yang tertinggal pada membran ekstrusi

Data rata-rata konsentrasi spiramisin yang tertinggal pada Membran Ekstrusi:

	Serapan		C <sub>membran</sub> (mg/ml)		C <sub>membran</sub> rata-rata (mg/ml)
	Percobaan	Percobaan	Percobaan	Percobaan	
	1	2	1	2	
F1 Eks. 0,4 µm	0,6204	0,7469	0,10	0,12	0,11
F1 Eks. 0,2 µm	0,7546	0,7481	0,12	0,12	0,12
F2 Eks. 0,4 µm	0,6563	0,6730	0,11	0,11	0,11
F2 Eks. 0,2 µm	0,7319	0,7560	0,12	0,12	0,12

**Contoh : Formula 1 Ekstrusi 0,4**

Hasil pengukuran serapan (A) percobaan 1 : 0,6204 dimasukkan ke dalam rumus:

$$\begin{aligned}
 y &= 0,0309x + 0,0080 \\
 0,6204 &= 0,0309x + 0,0080 \\
 x &= 19,82 \text{ ppm} = 19,82 \text{ µg/ml}
 \end{aligned}$$

Hasil pengukuran serapan (A) percobaan 2 : 0,7469 dimasukkan ke dalam rumus:

$$\begin{aligned}
 y &= 0,0309x + 0,0080 \\
 0,7469 &= 0,0309x + 0,0080 \\
 x &= 23,95 \text{ ppm} = 23,95 \text{ µg/ml}
 \end{aligned}$$



Maka, perhitungan jumlah spiramisin yang tertinggal di membran, menjadi:

$$\begin{aligned}
 \text{jumlah spiramisin} &= (\bar{x}) \times \text{vol. metanol} \\
 \text{jumlah spiramisin} &= 21,86 \frac{\text{µg}}{\text{ml}} \times 10 \text{ ml} = 218,6 \text{ µg} = 0,2186 \text{ mg}
 \end{aligned}$$


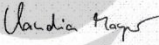
Karena volume spiramisin yang diekstrusi adalah 2 ml, maka konsentrasi membran (C<sub>membran</sub>) menjadi :

$$C_{\text{membran}} = \frac{0,2186 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = 0,1093 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 0,11 \text{ mg/ml}$$


Lampiran 37. Sertifikat analisis fosfatidilkolin/lesitin (*egg phosphatidylcholine*)

<b>SIGMA-ALDRICH®</b>		 <small>Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland Tel: +41 81 755 2511 Fax: +41 81 756 5449</small>
<b>Certificate of Analysis</b>		
<b>Product Name:</b>	L- $\alpha$ -PHOSPHATIDYLCHOLINE from egg yolk, ~ 60 % TLC	
<b>Product Number:</b>	61755	
<b>Product Brand:</b>	Sigma	
<b>Molecular Formula:</b>		
<b>Molecular Mass:</b>		
<b>CAS Number:</b>	8002-43-5	
<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>LOT BCBD3767 RESULTS</b>
<b>APPEARANCE (COLOR)</b>	YELLOW TO ORANGE	ORANGE
<b>APPEARANCE (FORM)</b>	POWDER TO SOLIDIFIED MASS OR CHUNKS	SOLIDIFIED MASS OR CHUNKS
<b>PURITY (TLC AREA %)</b>	$\geq 55.0$ %	76.5 %
<b>WATER</b>	$\leq 2.0$ %	0.7 %
<b>INFRARED SPECTRUM</b>	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
<b>QC RELEASE DATE</b>	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 38. Sertifikat analisis kolesterol

<b>SIGMA-ALDRICH</b>		 Riedstrasse 2, D-89555 Steinheim/Germany Tel: +49 73 2997 2550 Fax: +49 73 2997 2557
<b>Certificate of Analysis</b>		
<b>Product Name:</b>	CHOLESTEROL	
	95 %	
<b>Product Number:</b>	C75209	
<b>Product Brand:</b>	Sigma	
<b>Molecular Formula:</b>	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	
<b>Molecular Mass:</b>	386.65	
<b>CAS Number:</b>	57-88-5	
<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>LOT STBB5512 RESULTS</b>
<b>APPEARANCE (COLOR)</b>	WHITE	WHITE
<b>APPEARANCE (FORM)</b>	POWDER	POWDER
<b>PURITY (GC AREA %)</b>	≥ 94.0 %	94.1 %
<b>OPTICAL ROTATION</b>	-39 ± 6 DEGREES	-37 DEGREES
<b>CONCENTRATION</b>	C=2% DIOXANE	2% IN DIOXAN
<b>SOLUBILITY (COLOR)</b>	COLORLESS TO PALE YELLOW	COLORLESS
<b>SOLUBILITY (TURBIDITY)</b>	CLEAR TO SLIGHTLY HAZY	CLEAR
<b>SOLUBILITY (METHOD)</b>	1G/4.5ML, CHCL <sub>3</sub>	1G/4.5ML, CHCL <sub>3</sub>
<b>INFRARED SPECTRUM</b>	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
<b>QC RELEASE DATE</b>	22/JUN/10	
 Claudia Mayer, Manager Quality Control Steinheim, Germany		
<p align="center">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.</p>		
Sigma-Aldrich	Certificate of Analysis - Product C75209 Lot STBB5512	Page 1 of 1

Lampiran 39. 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

Date of examination (DD.MM.YYYY): 19.08.2010  
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY): 31.08.2013

Dr. Wolfgang Bolkart  
responsible laboratory manager-quality control

*This document has been produced electronically and is valid without a signature*

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany); +49 6151 72-0  
SA-7 2087535/8050389000/030000 V. 006 Date: 03.12.2010

Page 1 of 1



Lampiran 40. 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<sup>10</sup>  
4.12

样品编号 (Serial No) :2012620012

品名 Product Name	螺旋霉素 Spiramycin Base		数量 Quantity	300KG
生产批号 Batch No.	120130190M	有效日期 EXP Date	12/2014	
生产日期 MFG Date	01/2012	报告日期 Report Date	Jan.30, 2012	
检验依据 According to	EP2002			
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


**GLOBAL CHEMINDO MEGATRADING**  
 reliable partner in raw material business

PAGE : 1 OF 1