

## DISTRIBUSI LIPOSOMAL-METILPREDNISOLON PALMITAT (L-MPLP) PADA BEBERAPA ORGAN MENCIT SETELAH PEMBERIAN INTRA-PERITONEAL

Erni H Purwaningsih<sup>1</sup>, M Sadikin<sup>2</sup>, Oentoeng Soeradi<sup>3</sup>, Asri Rasad<sup>4</sup>, HJ Freisleben<sup>5</sup>

1. Departemen Farmasi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia
2. Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia
3. Departemen Biologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia
4. STK Yarsi, Jakarta 10510, Indonesia
5. Guru Besar Tamu FK UI, Frankfurt, Jerman

### Abstrak

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis distribusi liposomal-metilprednisolon palmitat (L-MPLP) di beberapa organ pada mencit C3H setelah pemberian secara intra-peritoneal. Sebagai formula baru, L-MPLP telah diuji tentang stabilitas dan inkorporasi secara *in vitro*. Inkorporasi metilprednisolon palmitat (MPLP) pada membran liposom meningkat dari 70 % menjadi 95 % setelah digunakan tetra eter lipid dalam komposisi liposom sebagai penstabil membran. Atas dasar penelitian tersebut, L-MPLP akan terdistribusi dengan lebih baik di beberapa organ pada mencit dibandingkan control yaitu MPLP sebagai obat bebas, metilprednisolon (MPL) sebagai standar dan liposom tanpa obat. Empat puluh dua mencit C3H dibagi ke dalam 5 grup penelitian. Setiap grup dibagi ke dalam 6 waktu penelitian. Setiap obat disuntikkan intra-peritoneal. Darah diambil dari vena ekor ( menit ke 10; 30; 60; 90; 180; dan jam ke 48) dan dilakukan ekstirpasi organ (hepar, limpa, timus, ginjal dan sumsum tulang) pada menit ke setelah mencit dimatikan dengan eter. Distribusi L-MPLP dalam organ tampak jelas pada menit ke 180 dan menurun setelah 48 jam. Distribusi obat atau metabolitnya tampak menonjol pada hepar, diikuti secara berurutan oleh limpa, timus, ginjal dan sumsum tulang.

### Abstract

**The Distribution of Liposomal-Methylprednisolone Palmitate (L-MPLP) in Several Organs in Mice after Intra-Peritoneal Injection.** This study was to analyze the distribution of liposomal-methylprednisolone palmitate (L-MPLP) as a new drug formulation, in several organs of mice after intra-peritoneal injection. In a previous study, *in vitro*, the stability and the incorporation of methylprednisolone palmitate into liposome membranes were increased, from 70% to approximately 95% using tetra-ether lipid as a stabilizer of the liposome membrane. Based on this result, the stability of L-MPLP should also be proved, *in vivo*, that the drug, methylprednisolone palmitate, could be distributed into several organs more effective than in a control group (methylprednisolone palmitate and methylprednisolone as a standard of drug and liposome). Forty-two mice of C3H were divided into 5 study groups. Each group of animals was divided into 6 sub-groups of time from 10 minutes to 48 hours. Each drug was injected intra-peritoneal, blood was drawn from the vein of the tail and the organs i.e. liver, kidneys, spleen, thymus, and bone marrow were extirpated after sacrificing the mice using ether. The distribution of the drug or their metabolites was higher at the minute of 180 and tended to decrease at the time of 48 hours after injection. The higher distribution was shown in the liver and rather high in the spleen, thymus, kidney, and bone-marrow respectively.

*Keywords: L-MPLP, tetra-ether lipid, organ-distribution, liver of mice*

### 1. Pendahuluan

Liposom sebagai bahan pembawa berbagai obat (*drug-carriers*) terbukti lebih efektif sebagai pembawa obat ke organ sasaran dan lebih aman dibandingkan control<sup>1-5</sup>, sehingga banyak penelitian dewasa ini menggunakan liposom sebagai

bahan pembawa obat, termasuk penemuan liposomal-metilprednisolon palmitat untuk efek immunosupresan oleh Purwaningsih dkk<sup>6</sup>. Penemuan ini didasarkan atas ketidakmampuan metilprednisolon sebagai immunosupresan, berinkorporasi ke dalam membran liposom, sebagaimana telah dilakukan oleh Mishina dkk.<sup>7</sup>, karena metilprednisolon membentuk misel. Terbentuknya misel tersebut, dibuktikan oleh Benameur dkk.<sup>8</sup> terhadap deksametason, yang mempunyai struktur kimia mirip metilprednisolon.

Senyawa baru liposomal-metilprednisolon palmitat (L-MPLP) telah dilaporkan oleh Purwaningsih dkk.<sup>9</sup> dalam hal kestabilan dan peningkatan inkorporasi metilprednisolon palmitat ke dalam membran liposom yang mengandung tetraeter lipid secara *in vitro*. Sebagai senyawa baru, L-MPLP perlu diuji secara *in vivo*, apakah pemberian L-MPLP secara intraperitoneal pada mencit, komposisi tersebut tetap stabil, sehingga bahan obat metilprednisolon palmitat yang dibawa oleh liposom akan terdistribusi dengan lebih baik dibandingkan kontrol (metilprednisolon palmitat dan metilprednisolon sebagai obat standar).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan bahwa L-MPLP akan terdistribusi dalam organ lebih baik dibandingkan kontrol.

## 2. Bahan dan Cara

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Farmakologi dan Patologi Anatomi dalam kurun waktu 6 bulan dari bulan Mei hingga Oktober 2001 yang dibiayai oleh Bank Dunia melalui Dirjen DIKTI/URGE *Project batch* No. IV, 1999-2000 dan sebagian bahan-bahan penelitian disumbang oleh Bernina Biosystems GmbH, Munich, Jerman.

### Bahan dan alat penelitian:

Empat puluh dua ekor mencit C3H berumur 12-16 minggu, berat badan 18-22 gram diperoleh dari hasil biakan murni Bagian Patologi Anatomi FKUI, dibagi ke dalam 5 kelompok perlakuan secara acak, terinci dalam uraian cara kerja.

Bahan aktif metilprednisolon-palmitat (MPLP) dan tetra-eter lipid (TEL) dari *Sulfolobus acidocaldarius* disintesis dan disumbangkan oleh Bernina Biosystems GmbH, Munich. Lesitin (*Egg-yolk phosphatidylcholine* =EPC) dari Lipoid. Semua bahan berupa lipid disimpan pada suhu -80°C. Metilprednisolon dibeli dari SIGMA, pelarut dengan derajat kromatografi seperti kloroform, etanol absolut, metanol, asetonitril dari Riedel de Haën dan Merck; diklorometan dari Merck, akuabides steril dari PT Ika Farma, akua tanpa mineral diperoleh dari Lab. Farmakologi FKUI. Sephadex G-75 dari Pharmacia Upsalla, larutan dapar PBS pH 7,4 dari Merck yang difiltrasi melalui membran Millipore 0,45 µm sebelum digunakan. TLC-sheet silica 60/ F254 dari Merck. Penanda bercak digunakan larutan kuper-asetat (3%) dan asam fosfat (8%). Aplikasi sampel pada TLC-sheet digunakan Hamilton syringe 10 µL. Oven suhu 180°C buatan Sheima, termometer skala 250°C, vorteks, rotavapor Yamato, penangas air 30-40°C, pompa vakum dengan kapasitas maksimum 39 cmHg. Gas N<sub>2</sub> dari PT Panca Setia. Kolom gelas 20 X 1.2 cm untuk GFC berisi Sephadex G-75 sebagai fase diam larutan dapar PBS pH 7.4 sebagai fase gerak. Pengereng TLC dari Sanyo. *Avestin liposomal extruder* dipinjamkan oleh Prof. DR. Freisleben, sedangkan membran polikarbonat 100 nm dibeli dari Avestin.

Program *Presto Page Manager* dan *Adobe Photo-Shop 6.0* untuk analisis bercak pada TLC.

### Cara kerja :

1. Preparasi liposomal-metilprednisolon palmitat dan pengukuran kadar inkorporasi menurut metode Purwaningsih dkk<sup>9</sup>.
2. Perlakuan pada binatang percobaan.

Mencit dibagi ke dalam 5 kelompok sebagai berikut:

- Kelompok-I: kontrol, tanpa perlakuan (6 ekor).
- Kelompok-II: inj. Liposom 100 µL, IP, mengandung 0,7 mg EPC; 36 µg TEL (8 ekor, dibagi 4 sub-kelompok).
- Kelompok-III: inj. MPLP dalam DMSO 100 µL, IP, 400 µg atau 20 mg/kgBB (8 ekor, dibagi 4 sub-kelompok).
- Kelompok-IV: inj. MPL-Na suksinat (Solu-Medrol<sup>®</sup>) 50 µL, IP, mengandung 200 µg MPL atau 10 mg/kgBB (8 ekor, dibagi 4 sub-kelompok)
- Kelompok-V: inj. L-MPLP 100 µL, IP, mengandung 40 µg MPLP atau 2 mg/kgBB (12 ekor, dibagi 6 sub-kelompok)

Untuk menilai keberadaan obat dalam serum, darah diambil dari vena ekor pada menit ke 10; 30; 60; 120; 150 dan 48 jam setelah penyuntikan. Segera setelah darah terkumpul, hewan dimatikan dalam sungkup yang berisi eter. Setelah hewan mati, organ hepar, limpa, timus, ginjal kiri - kanan, dan sumsum tulang segera dieksisi, ditimbang dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sebelum dilakukan pengukuran selanjutnya.

Untuk uji distribusi obat dalam organ, maka organ dieksisi pada menit ke 30; 60; 90; dan 150 dan 180 untuk kelompok II-IV; pada menit ke 30; 60; 90; 150; 210; dan 48 jam untuk kelompok I dan V. Perbedaan waktu antara pengambilan darah dan organ yang berkisar antara 20 menit disebabkan oleh lamanya pengambilan darah dari vena ekor.

Ekstraksi serum dan organ serta pengukuran besar distribusi obat dilakukan menurut metode berikut ini:

### Proses ekstraksi dan Pengukuran kadar L-MPLP serum dan organ dengan TLC.

#### A. Ekstraksi Serum

Dengan menggunakan metode Frey dkk.<sup>10</sup>, kadar steroid internal tidak perlu dihilangkan dengan karbon aktif, sehingga lebih praktis. Serum atau plasma sebanyak 200  $\mu\text{L}$ , diekstraksi dengan menggunakan campuran metilen klorida - eter 2:1 (perbandingan antara plasma dan pelarut 1:9), dikocok selama 20 menit dan disentrifugasi 3.000 rpm selama 10 menit.

- Fasa organik dipindahkan dan tambahkan ke dalamnya 400  $\mu\text{L}$  HCl 0,1 mol/L, kemudian dikocok dan disentrifugasi dengan cara yang sama.
- Fasa air dibuang dan fasa organik dicuci 2 kali dengan 400  $\mu\text{L}$  NaOH 0,1 mol/L dan akuades. Pengocokan dan sentrifugasi diulang dengan cara yang sama.
- Fasa organik dipindahkan dan diuapkan dengan aliran gas  $\text{N}_2$  hingga kering.
- Dilarutkan dengan 50  $\mu\text{L}$  kloroform-metanol 2:1, sesaat sebelum diaplikasikan pada TLC.
- Diaplikasikan 1  $\mu\text{L}$  pada TLC dan dikeringkan dengan aliran udara panas (menggunakan pengering rambut).
- Dielusi dengan eluen kloroform-etanol 9:1, sampai pada penanda batas atas.
- Dikeringkan dengan aliran udara panas dan celupkan ke dalam larutan pewarna bercak selama 10 detik.
- Dikeringkan dan dimasukkan ke dalam oven bersuhu  $180^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit.

#### B. Ekstraksi Organ (Jonung dkk,<sup>11</sup>).

Dua ratus mg sampel hepar beku, (untuk organ lain timus, limpa, sumsum tulang dan ginjal diekstraksi semuanya karena beratnya kurang dari 200 mg) diekstraksi dengan 1-2 mL metanol setelah dihomogenisasi dengan Teflon *homogenizer* Lurex<sup>®</sup> secara manual. Kemudian, disentrifugasi pada 1000 g (3000 rpm) selama 30 menit. Supernatan yang jernih dipindahkan ke dalam tabung lain dan diuapkan dengan aliran udara panas atau gas  $\text{N}_2$  hingga kering, yang disebut residu.

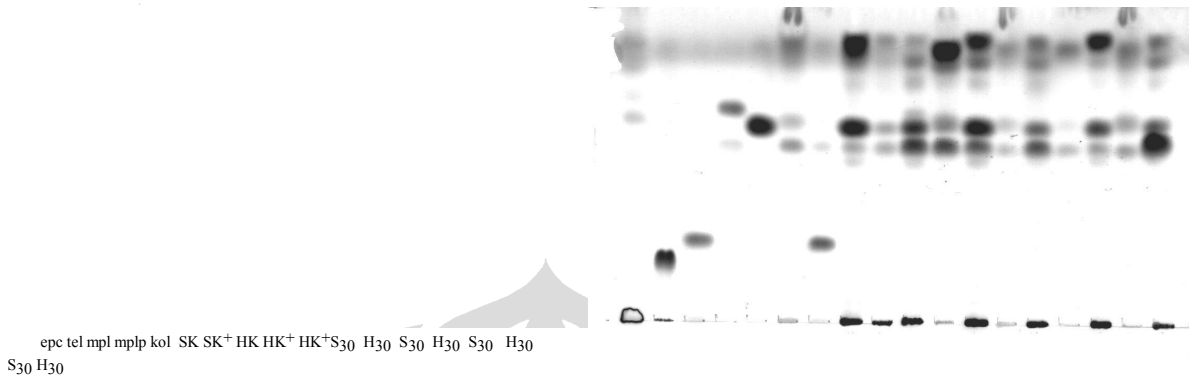
- Residu dilarutkan dengan 1,5 mL etilasetat dan 0,5 mL NaOH 0,01 M atau 0,1 M dan segera dikocok dan disentrifugasi dengan cara yang sama.
- Supernatan dipindahkan dan diuapkan dengan cara yang sama hingga kering dan kemudian dilarutkan dengan 300  $\mu\text{L}$  kloroform-metanol 2:1 untuk hepar dan limpa, 100  $\mu\text{L}$  untuk ginjal dan 50  $\mu\text{L}$  untuk timus dan sumsum tulang.
- Diaplikasikan 1  $\mu\text{L}$  pada TLC dan diproses dengan cara yang sama.
- Pada TLC-*sheet* yang sama, dibuat standar MPLP dengan dosis 0; 2; 4; 6  $\mu\text{g}$  untuk pembuatan kurva kalibrasi. Sebagai kontrol adalah EPC, kolesterol, TEL dan MPL.
- Berdasarkan persamaan regresi dari kurva kalibrasi, dapat dihitung distribusi MPLP atau MPL dalam organ.

### 3. Hasil dan Diskusi

Distribusi "metabolit" MPLP atau MPL dalam serum dan hepar setelah penyuntikan dari ke lima kelompok perlakuan tampak pada Gambar 1 (setelah menit ke 30); Gambar 2 (menit ke 90); Gambar 3 (menit ke 150). Perbandingan gambaran bercak antara serum dan organ menunjukkan bercak dengan *Rf* berturut-turut dari bawah ke atas adalah pada *Rf* 0,55; 0,6; 0,79 dan 0,85. Perbandingan bercak pada berbagai organ setelah penyuntikan L-MPLP tampak pada Gambar 4 (menit ke 30), Gambar 5 (menit ke 180) dan Gambar 6 (setelah 48 jam). Pada sumsum tulang, selain bercak dengan *Rf* yang sama, juga terdapat bercak lain pada *Rf* 0,03 dan 0,05.

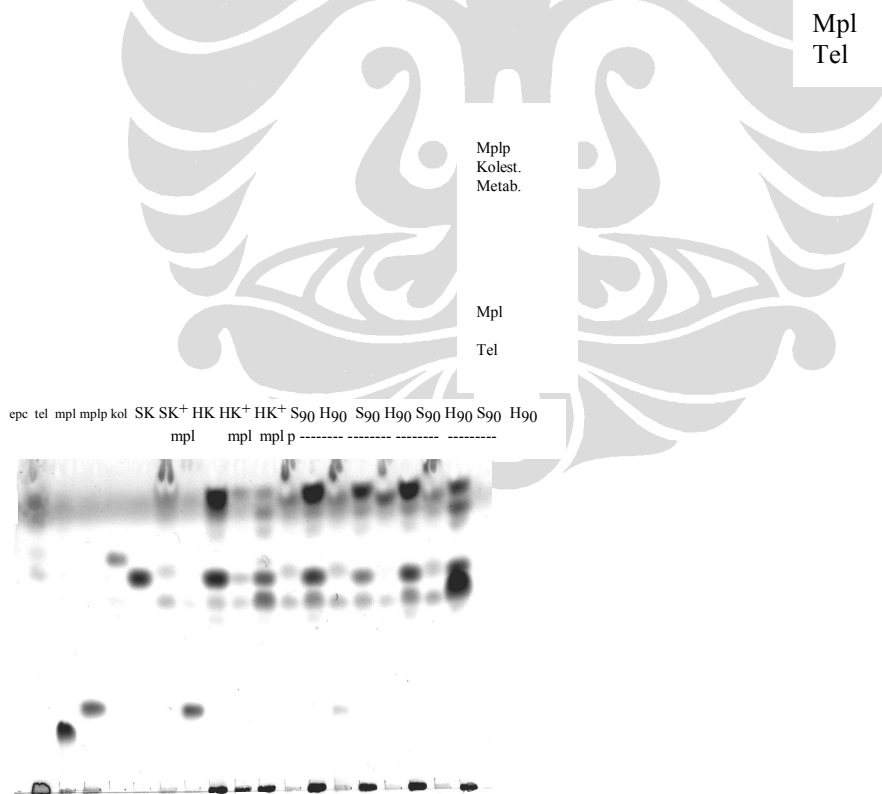
Untuk memisahkan bercak hasil ekstraksi organ, baik berupa hasil metabolit maupun produk lain yang letaknya berdekatan, dicoba dipisahkan dengan menggunakan beberapa eluen. Hasilnya berupa nilai *Rf* yang berbeda-beda (Tabel 1). Sebagai contoh, elusi dengan kloroform/etanol = 9:1 menunjukkan *Rf* hasil

Batas elusi

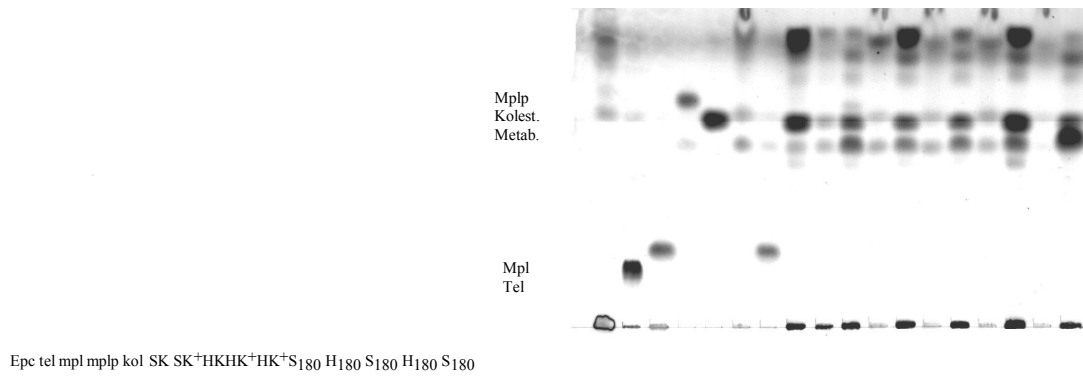


Keterangan: epc=fosfatidilkolin; tel=tetreeterlipid; mpl=metilprednisolon; mplp=metilprednisolon-palmitat; SK=serum kontrol; HK=hepar kontrol; S/H<sub>30</sub>=pada menit ke 30. Lipos=liposom; Mplp Kolest. Metab. L-MPLP=liposom-metilprednisolon

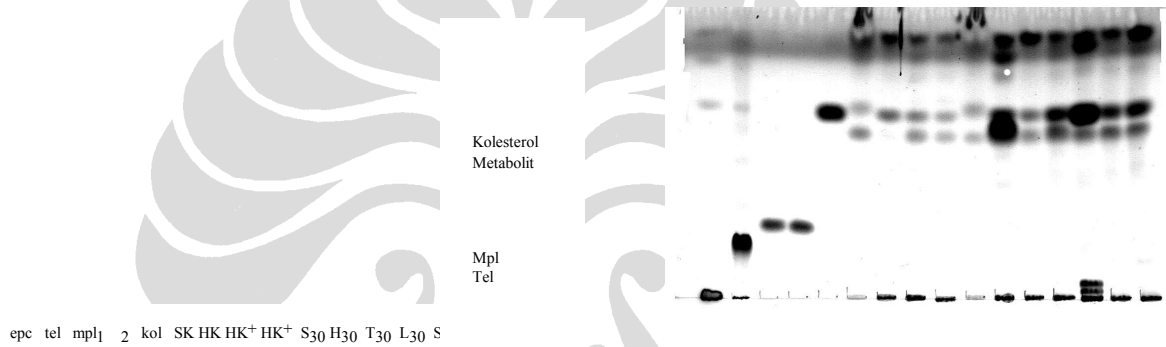
Gambar 1. Distribusi L-MPLP/metabolit pada serum dan hepar pada menit ke 30.



Gambar 2. Distribusi L-MPLP/metabolit pada serum dan hepar, menit ke 90

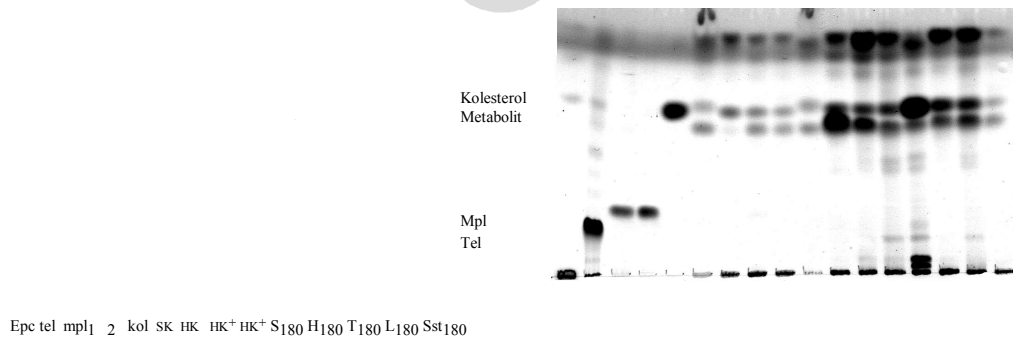


Gambar 3. Distribusi L-MPLP/metabolit pada serum dan hepar, menit ke180

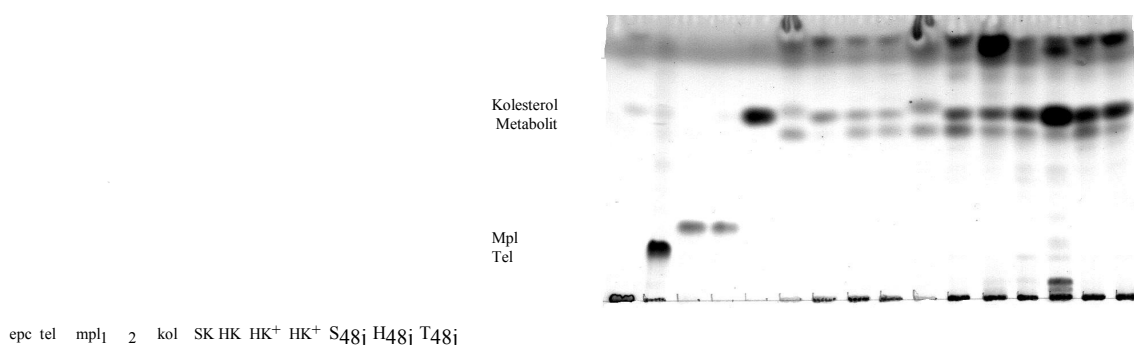


Keterangan: epc=eggvolk-phosphatidylcholine; tel=tetraether lipid; mpl=metilprednisolon; SK=serum kontrol; HK=hepar kontrol; S=serum; H=hepar; T=timus; L=limpa; Sst=sumsum tulang; G=ginjal

Gambar 4. Distribusi L-MPLP/metabolit dalam berbagai organ, menit ke 30.



Gambar 5. Distribusi L-MPLP/metabolit dalam organ, menit ke 180.



Gambar 6. Distribusi L-MPLP/metabolit dalam organ, setelah 48 jam.

Tabel 1. Perbandingan nilai  $R_f$  dari berbagai eluen

Jenis Bahan	Nilai $R_f$ pada eluen:					
	A	B	C	D	E	F
TEL	0,16	0	0,06	0,19	0,62	0,36
MPL	0,21	0	0,13	0,25	0,67	0,51
MPLP	0,61	0,18	0,48	0,67	0,88	0,9
KOL.	0,59	0,35	0,47	0,87	0,72	0,74
Metab. 1	0,52	0,21	0,37	0,7	0,05	0,01
Metab. 2	0,81	>1	0,86	0,87	0,82	0,86

A:kloroform/etanol=9:1.B:kloroform/etanol=97:3.

C:kloroform/etanol=93:7.D:heksan/(heksan/prop.alkohol)=20:80.

E:kloroform/metanol/asetonitril=65:17,5:17,5.

F: kloroform/metanol/asetonitril=80:10:10

metabolit pada hepar berturut-turut dari bawah ke atas : 0,52; 0,59; 0,81, sedangkan  $R_f$  TEL; MPL dan MPLP berturut-turut adalah 0,16; 0,21; 0,61 Hasil elusi dengan kloroform/etanol = 97:3 menunjukkan  $R_f$  metabolit: 0,21; 0,35 dimana bercak TEL dan MPL terletak pada garis dasar ( $R_f=0$ ) sedangkan bercak MPLP adalah 0,18; 0,21 dimana bercak TEL, MPL dan MPLP adalah 0,36; 0,51 dan 0,9. Gambaran lengkap perbandingan bercak metabolik MPLP atau MPL dalam berbagai eluen dibandingkan dengan bercak TEL, MPL dan MPLP sebagai kontrol disajikan pada Tabel 1.

Dengan menggunakan piranti lunak program *Presto Page Manager* dan *Adobe Photoshop 5.0 /6.0*, bercak pada TLC dapat di-scan dan dihitung nilai rata-rata dan jumlah piksel (*pixels*), dalam menu histogram. Nilai rata-rata bercak dikurangi nilai rata-rata daerah tanpa bercak (latar belakang atau dasar) dikalikan dengan jumlah piksel dihasilkan nilai integral. Perhitungan dan pembuatan kurva kalibrasi untuk mendapatkan persamaan regresi dilakukan dengan menggunakan program *Microsoft Excel*.

Untuk menghitung secara semi kuantitatif distribusi metabolit MPLP/MPL dalam organ, dalam hal ini hanya ke dalam hepar kontrol tanpa perlakuan, ditambahkan sejumlah MPL (20  $\mu\text{g}$ ) atau MPLP (11  $\mu\text{g}$ ) setelah ekstraksi dengan metanol dan selanjutnya diproses sesuai prosedur standar. Bercak pada TLC tidak sedikitpun memberikan bercak MPLP, bercak sangat lemah untuk penambahan MPL namun keduanya menunjukkan bercak cukup kuat sesuai  $R_f$  metabolit MPLP/MPL yaitu 0,52 dalam eluen kloroform/etanol = 9:1 dan besar bercak metabolit terbukti tergantung pada dosis dengan nilai regresi ( $r^2$ ) berkisar antara 0,92-0,96.

Perhitungan berdasarkan persamaan regresi dengan menggunakan metabolit MPL/MPLP pada  $R_f$  0,52 sebagai standar, maka kadar metabolit MPL/MPLP sangat tinggi pada hepar dan dijumpai setelah 30 menit penyuntikan L-MPLP yang mengandung 40  $\mu\text{g}$  MPLP yaitu sebesar 12,9  $\mu\text{g}$ . 60 menit setelah penyuntikan, kadar metabolit menjadi 10,4  $\mu\text{g}$  dan tampak menurun setelah 48 jam penyuntikan (tidak dihitung).

Apabila nilai integral bercak metabolit pada beberapa organ (hepar, timus, limpa, sumsum tulang, ginjal kanan) pada menit ke 30; 60; 90; 120; 180; 210 dan setelah 48 jam dibandingkan dengan organ kontrol (tanpa perlakuan), dihasilkan besaran nilai metabolit

**Tabel 2. Jumlah/besaran metabolit MPLP/MPL\* dalam organ pada menit ke 30; 60; 90; 150; 180 dan 48 jam setelah penyuntikan L-MPLP, IP.**

Menit ke	Besaran metabolit ( $\mu\text{g}$ ) dibandingkan dengan organ kontrol					
	Hepa r	Timu s	Limp a	Ss.tln g	Ginja l kana n	Ginj al kiri
30	10,66	1,23	3,28	0,65	0,81	3,25
60	13,48	5,35	5,88	1,01	3,49	6,71
90	12,02	-	5,15	3,94	3,63	7,86
150	15,19	1,26	0,85	2,84	1,4	2,52
210	16,33	8,22	2,52	2,7	1,4	5,47
48 jam	3,3	0,75	0,31	0,03	-	0,87

\* Eluen kloroform/etanol = 93:7 - sampel (-)

**Tabel 3. Perbandingan jumlah "metabolit" MPLP/MPL\* dalam hepar setelah penyuntikan L-MPLP, MPL, MPLP, Liposom.**

Menit ke	Jumlah metabolit ( $\mu\text{g}$ ) dalam hepar setelah penyuntikan			
	Lip.	MPL	MPLP	MPLP
30	0,28	0,3	0,001	0,88
60	0,24	0,08	0,499	0,84
90	0,27	0,21	0,2	1,6
150	0,3	0,32	0,44	1,39

Men=menit; Lip=liposom; MPL=metilprednisolon;  
MPLP=metilprednisolon palmitat

yang ditampilkan pada Tabel 2, sedangkan kadar metabolit dalam hepar dari ke lima perlakuan tampak pada Tabel 3.

## Diskusi

Penggunaan TLC untuk deteksi dan pengukuran kadar metabolit MPL atau MPLP karena, dengan menggunakan HPLC atau GC yang dilakukan di Laboratorium Doping Jakarta, Dinas Kesehatan DKI Jakarta, tidak menunjukkan adanya MPL atau MPLP dalam organ (data tidak ditampilkan). Pengukuran kadar MPL dengan alat lain misalnya GC-MS tidak mungkin dilakukan, karena keterbatasan peralatan penunjang dan jangka waktu pemakaian alat akibat prosedur ekstraksi organ tersebut, memerlukan waktu yang cukup lama yaitu antara 3-12 jam dan kurang praktis.

Gambaran distribusi L-MPLP atau metabolitnya tampak nyata dalam organ yang kaya akan sistem retikulum-endoplasma, yaitu hepar dan limpa, setelah pemberian L-MPLP secara IP. Gambaran distribusinya pada organ limfoid lain, juga menunjukkan hasil yang cukup jelas. Distribusi pada organ mulai tampak jelas pada menit ke 30,

kemudian meningkat pada menit ke 180 dan menurun setelah 48 jam penyuntikan (Tabel 2, Gambar 4-6). Dalam jangka waktu pengamatan yang sama, secara berurutan, distribusi ke hepar lebih besar dibandingkan pada limpa, ginjal, timus, dan sumsum tulang. Gambaran distribusi dalam organ tersebut mirip dengan distribusi sediaan obat lipofil lainnya, terutama turunan glukokortikoid, yang diinkorporasikan pada membran liposom, yaitu MPL<sup>12</sup> atau yang mengandung DMP<sup>13</sup> ke dalam emulsi lipid. Distribusi liposom-prednisolon juga menunjukkan distribusi ke dalam organ yang sama setelah pemberian intra muskular pada tikus<sup>14</sup>.

Ekstraksi organ berdasarkan metode Jonung, dkk<sup>11</sup> pada tikus dan ekstraksi serum menurut Frey dkk.<sup>10</sup>, merupakan metode yang paling sederhana, mudah dan tidak membutuhkan banyak waktu. Namun ternyata, hasil ekstraksi organ dan serum mencit setelah perlakuan dengan pemberian L-MPLP atau dengan pemberian MPL atau MPLP pada kontrol, berdasarkan metode tersebut, tidak memberikan hasil sebagaimana yang mereka lakukan. Metode Jonung dkk.<sup>11</sup> yang menggunakan metanol, etilasetat dan NaOH 0,01 M serta metode Frey dkk.<sup>10</sup> yang menggunakan metilen klorida-eter 2:1, HCl 0,1 M dan NaOH 0,1 M digunakan sebagai acuan untuk mendeteksi adanya MPL pada HPLC, dari waktu ke waktu setelah pemberian MPL pada tikus secara intra vena. Meskipun dengan mengubah metode yaitu metode Frey dengan metode Jonung, gambaran bercak tetap tidak menunjukkan adanya MPL atau MPLP. Dengan memodifikasi metode Jonung, yaitu dengan meningkatkan molaritas NaOH dari 0,01 M menjadi 0,1 M dan mengocok campuran bahan pereaksi (etilasetat dan NaOH 0,1 M) selama 24 jam pada suhu 4°C, metabolit MPL atau MPLP menjadi MPL tidak dapat dipecahkan (data tidak ditampilkan). Dua bercak metabolit terbawah (dari 3 posisi bercak: bawah, tengah dan atas) yang mempunyai *Rf* berdekatan dengan *Rf* MPLP juga tidak berhasil dipisahkan dengan berbagai jenis eluen atau modifikasinya (lihat Tabel 1) yang umumnya digunakan sebagai fase gerak pada pemeriksaan dengan HPLC 15-16. Bercak "tengah" identik dengan *Rf* kolesterol, setelah kolesterol digunakan juga sebagai kontrol (Gambar 1-6).

Pemeriksaan bercak dengan sinar UV, baik kolesterol maupun metabolit MPL atau MPLP yang mempunyai struktur yang berbeda dengan struktur senyawa awalnya, tidak dapat dideteksi pada panjang gelombang 254 nm atau 366 nm. Menurut Duncan dkk.<sup>17</sup>, kolesterol dapat dideteksi pada panjang gelombang 200 nm, sedangkan metabolit MPL atau MPLP diharapkan dapat dideteksi pada panjang gelombang 230 nm setelah metabolit tersebut, direaksikan dengan metode benzoilisasi<sup>18</sup>.

Setelah pewarnaan dengan larutan tembaga-asetat 3% dan asam fosfat 8%, gambaran bercak pada TLC yang sama, memberikan nilai *Rf* sebagai berikut : EPC kontrol 0 (agak kuat) dan 0,88 (agak lemah); TEL kontrol 0,06 (bukan 0,59 pada UV); MPL kontrol 0,12 (UV:0,1); MPLP kontrol 0,5 (UV:0,52); Kolesterol 0,56 (UV:-). *Rf* pada serum: 0,45 (lemah), 0,54 (lemah) dan 0,88 (agak kuat). Pada hepar, timus dan terutama pada sumsum tulang kontrol, bercak tampak kuat pada *Rf* 0,54. Bercak pada *Rf* 0,88 sangat kuat pada timus, dibandingkan pada hepar dan lemah pada sumsum tulang. Bercak sangat kuat pada hepar dengan injeksi L-MPLP tampak pada *Rf* 0,45; *Rf* 0,54 (kuat) dan 0,88 (sedang), dibandingkan dengan timus dan sumsum tulang pada waktu yang sama. Pada organ baik kontrol maupun dengan perlakuan (tidak pada serum), terlihat gambaran bercak yang kuat pada *Rf* 0 dibandingkan dengan bercak EPC atau TEL kontrol (lihat Tabel 2).

Untuk sementara dapat disimpulkan, bahwa bercak pada *Rf* 0,45 merupakan suatu metabolit, sedangkan bercak dengan *Rf* 0,54 adalah kolesterol dan bercak pada *Rf* 0,88 kemungkinan besar adalah PC. Untuk membuktikan lebih lanjut apakah bercak pada *Rf* 0,88 adalah PC, dianjurkan pengujian serupa, namun berbeda dalam hal pewarnaan bercak, yaitu dengan mengganti larutan yang mengandung tembaga-asetat 3% dan asam fosfat 8% dengan larutan *Zinzade*, yang merupakan reagen spesifik untuk mendeteksi fosfat, dalam hal ini PC. Larutan ini mengandung natrium molibdat dinitrat, hidrazin sulfat dan asam sulfat<sup>19</sup>.

Dengan menggunakan eluen yang berbeda, yaitu kloroform-etanol 9:1, dapat memisahkan bercak secara lebih tajam, antara bercak metabolit MPLP dan bercak kolesterol. Dengan menggunakan eluen tersebut, perbedaan *Rf* di antara keduanya cukup besar, yaitu sebesar 0,15 (*Rf* metabolit 0,52; *Rf* kolesterol 0,67). Dalam eluen kloroform-etanol 93:7, perbedaan *Rf*-nya hanya sebesar 0,09 (*Rf* metabolit 0,45; *Rf* kolesterol 0,54).

Peneliti lain, Skrabalak dkk.<sup>20</sup> yang juga menggunakan TLC dengan eluen yang sama, yaitu kloroform-etanol 9:1, bercak MPL terletak pada *Rf* 0,33, sedangkan pada penelitian ini, *Rf* MPL untuk kontrol adalah 0,24. Perbedaan ini kemungkinan besar disebabkan oleh jenis medium TLC yang digunakan. Sayangnya, peneliti tersebut tidak menyebutkan jenis medium TLC yang digunakan.



Bercak dengan  $R_f$  0,67 terbukti adalah kolesterol dengan nilai  $R_f$  yang sama pada kolesterol kontrol, sedangkan bercak dengan  $R_f$  0,81 diduga adalah EPC. Pada kontrol EPC, tampak bercak lemah pada  $R_f$  tersebut. Kesimpulan sementara adalah, bahwa bercak dengan  $R_f$  0,52 merupakan metabolit MPL atau MPLP. Hal ini dibuktikan lebih lanjut dengan penambahan MPL (mpl) ataupun MPLP (mplp) pada proses ekstraksi hepar kontrol (tanpa perlakuan=HK) menjadi HK+mpl atau HK+mplp. Pada TLC, keduanya memberikan gambaran bercak yang cukup kuat pada  $R_f$  0,52 tanpa bercak untuk MPLP maupun MPL (Gambar 1-4). Pembuktian dilanjutkan dengan mengaplikasikan keduanya pada TLC dengan beberapa dosis menurut deret hitung (1, 2, 3  $\mu$ L). Hasil *scanning* ke tiga bercak pada  $R_f$  0,52, baik HK+mpl maupun HK+mplp menunjukkan ukuran yang bergantung pada dosis (*dose-dependent*) dengan nilai regresi ( $R^2$ ) antara 0,92-0,96 yang diperoleh dari beberapa pengujian.

Pada Tabel 2 ditunjukkan gambaran distribusi metabolit hasil penyuntikan L-MPLP pada organ dengan distribusi tertinggi, yang secara berurutan terjadi pada organ hepar, limpa, ginjal, timus, dan sumsum tulang. Perhitungan secara semi-kuantitatif terhadap distribusi L-MPLP pada hepar dengan menggunakan *scanner* terhadap bercak metabolit pada TLC, dibandingkan dengan kontrol menunjukkan, bahwa distribusi L-MPLP lebih baik daripada kontrol, tanpa atau dengan perlakuan, yaitu penyuntikan MPL atau MPLP atau liposom saja.

Metabolit MPL atau MPLP yang belum dapat diidentifikasi tersebut mirip dengan hasil penelitian lain oleh Skrabalak dkk.<sup>20</sup> yang menggunakan deksametason intra muskular pada kuda. Mereka menyebutkan, bahwa hasil metabolisme deksametason dalam urin kuda dinyatakan sebagai "metabolit" deksametason. Deteksi pada TLC dengan eluen kloroform – etanol 9:1 menunjukkan  $R_f$  0,27 yang berbeda dengan deksametason standar yaitu 0,34. Semua hasil berupa bercak-bercak yang diduga merupakan bercak metabolit, EPC atau bercak kolesterol, harus diuji lebih lanjut. Selain menggunakan detektor dengan panjang gelombang 200 nm untuk kolesterol<sup>17</sup> atau reaksi benzoilisasi untuk metabolit MPL atau MPLP yang dideteksi pada panjang gelombang 230nm<sup>18</sup> atau menggunakan larutan *Zinzade* untuk bercak EPC<sup>19</sup>, uji lain yang disarankan antara lain dengan identifikasi bercak menggunakan *Infra Red Spectroscopy* (IRS), *Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry* (NMRS) dan atau *Mass Spectrometry* (MS)<sup>21</sup>. Dengan IRS dapat diperkirakan gugus fungsionalnya, sedangkan dengan NMRS atau MS dapat diperkirakan struktur dan berat molekulnya. Akan tetapi, pengujian dengan ke dua cara tersebut masih tetap merupakan masalah yang belum dapat dipecahkan pada saat ini, karena 1) diperlukan sampel hasil pemurnian bercak yang cukup besar, 2) belum adanya bahan standar metabolit sebagai kontrol. Selain berbagai uji tersebut, cara lain yang dapat digunakan adalah dengan menandai MPLP. Penandaan dengan [<sup>3</sup>-H] seperti yang telah dilakukan oleh Mishina, dkk<sup>12</sup> untuk metilprednisolon, Benameur, dkk<sup>13</sup> untuk DMP, Shaw, dkk<sup>22</sup> untuk kortisol-palmitat serta Shinozawa, dkk<sup>14</sup> untuk prednisolon, kemudian dideteksi dengan *Scintillation counter*.

Dari data-data tersebut dapat disimpulkan, bahwa penyuntikan L-MPLP, IP, pada mencit menunjukkan, bahwa distribusi obat terbesar adalah pada hepar, yang mulai tampak pada menit ke 30 dan tertinggi pada menit ke 180, kemudian diikuti secara berurutan pada limpa, ginjal, timus dan terendah pada sumsum tulang, dibandingkan kontrol (liposom, MPLP dan MPL). Distribusi L-MPLP dalam bentuk metabolit tersebut, harus diuji lebih lanjut untuk menentukan struktur kimianya dengan menggunakan GC-MS serta kadarnya secara kuantitatif dengan HPLC.

Distribusi L-MPLP pada organ yang terbukti lebih baik dibandingkan kontrol perlu diteliti lebih lanjut, untuk membuktikan bahwa L-MPLP dapat memberikan efek imunopresesan secara umum dan secara khusus pada transplantasi organ, baik *in vitro* maupun *in vivo*.

## Daftar Acuan

1. Huang SK, Mayhew E, Gilani S, Lasic DD, Martin FJ, Papahadjopoulos D. Pharmacokinetics and therapeutics of sterically stabilized liposomes in mice bearing C-26 colon carcinoma. *Cancer Research* 1992; 52: 6774-81.
2. Gabizon AA. Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes. *Cancer Research* 1992; 52: 891-6.
3. Freise CE, Liu T, Hong K, et al. The increased efficacy and decreased nephrotoxicity of cyclosporine liposome. *Transplantation* 1994; 579(6): 928-32.
4. Freisleben HJ, Groth N, Fuchs J, Rudolph P, Zimmer G, Herrling T. Penetration of spin-labeled dihydrolipoate into the skin of hairless mice. Modification of epidermal and dermal polarity. *Drug Research* 1994; 44(II-9): 1047-50.

5. Matsui H, Johnson LG, Randell SH, Boucher RC. Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272(2): 1117-26.
6. Purwaningsih EH, et al. Incorporation Methylprednisolone Palmitate into Liposome's membrane. Perpustakaan FKUI, 2000 WK757, P985.
7. Mishina EV, Straubinger RM, Pszczynski NA, Jusko WJ. Enhancement of tissue delivery and receptor occupancy of methylprednisolone in rats by a liposomal formulation. *J Pharmac Res* 1993; 10(10): 1402-9.
8. Benameur H, De Gand G, Brasseur R, Van Vooren JP, Legros FJ. Liposome-incorporated dexamethasone palmitate: Chemical and physical properties. *Int J Pharmac* 1993; 89: 157-67.
9. Purwaningsih EH, Freisleben HJ, Sadikin M. Peningkatan inkorporasi methylprednisolon palmitat pada liposom yang mengandung tetraeter lipid dari membran Sulfolobus acidocaldarius, membentuk sediaan baru liposomal metilprednisolon palmitat. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2002; 1(1): 24-30.
10. Frey FJ, Frey BM, Benet LZ. Liquid-chromatographic measurement of endogenous and exogenous glucocorticoids in plasma. *Clin Chem* 1979; 25(11): 1944-7.
11. Jonung M, Björkman S, Idvall J. Determination of methylprednisolone in rat tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chrom* 1987; 415: 35-44.
12. Mishina EV, Straubinger RM, Pszczynski NA, Jusko WJ. Enhancement of tissue delivery and receptor occupancy of methylprednisolone in rats by a liposomal formulation. *J Pharmac Res* 1993; 10(10): 1402-9.
13. Benameur H, Latour N, Schandene L, van Vooren JP, Flamion B, Legros FJ. Liposome-incorporated dexamethasone palmitate inhibits in-vitro lymphocyte response to mitogen. *J Pharm Pharmacol* 1995; 47: 812-17.
14. Shinozawa S, Araki Y, Oda T. Distribution of [<sup>3</sup>H] prednisolone entrapped in lipid layer of liposome after intramuscular administration in rats. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 1979; 24(2): 223-32.
15. Kong A-N, Slaughter RL, Jusko WJ. Simultaneous analysis of methylprednisolone hemisuccinate, cortisol and methylprednisolone by normal-phase high-performance liquid chromatography in human plasma. *J Chrom* 1988; 432: 308-14.
16. Anonim. Normal phase column for detecting steroids on HPLC measurement. *Chrompack* 1986:124.
17. Duncan IW, Culbreth PH, Burtis CA. Determination of free, total, and esterified cholesterol by high-performance liquid chromatography. *J Chrom* 1979; 162: 281-92.
18. Novotny M, Alasandro M, Konishi M. Microcolumn liquid chromatography of benzoyl derivatives of steroid metabolites. *Anal Chem* 1983; 55: 2375-7.
19. Haughey DB, Jusko WJ. Analysis of methylprednisolone, methylprednisone and corticosterone for assessment of methylprednisolone disposition in the rat. *J Chrom* 1988; 430: 241-48.
20. Skrabalak DS, Covey TR, Henion JD. Qualitative detection of corticosteroids in equine biological fluids and the comparison of relative dexamethasone metabolite / dexamethasone concentration in equine urine by micro-liquid chromatography - mass spectrometry. *J Chrom* 1984; 315: 359-72.
21. Doi M, Ishida T, Sugio S, Imagawa T, Inoue M. Physicochemical properties of dexamethasone palmitate, a high fatty acid ester of an anti-inflammatory drug: polymorphism and crystal structure. *J Pharmac Sci* 1989; 78(5): 417-22.
22. Shaw IH, Knight CG, Dingle JT. Liposomal retention of a modified anti-inflammatory steroid. *J Biochem* 1976; 158: 473-6.