

UJI STABILITAS FISIK, KIMIA DAN BIOLOGIK TERHADAP FORMULASI TERBARU LIPOSOM TETRA ETER LIPID (EPC-TEL 2,5) SEBAGAI PEMBAWA OBAT (*Drug Carrier*)

Ernie H. Purwaningsih¹, Wawaimuli Arozal², Sri Widia A. Jusman³

1. Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia
2. Departemen Farmakologi dan Terapeutik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia
3. Departemen Biokimia dan Biomolekular, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

E-mail: erniepoerwa@yahoo.com

Abstrak

Telah dilakukan penelitian untuk menguji stabilitas fisik dan kimia secara *in vitro* dan stabilitas biologik secara *in vivo* terhadap formula terbaru liposom EPC-TEL2,5. Liposom sebagai pembawa berbagai obat (*drug carrier*) yang berukuran 50 – 200 nanometer, merupakan salah satu produk teknologi nano (*nanotechnology*). Liposom ini merupakan formulasi terbaru yang mengandung lesitin / fosfatidilkolin kuning telur (*egg yolk phosphatidyl choline*=EPC dan Tetra eter lipid (TEL) 2,5 mol % dari *Sulfolobus acidocaldarius* atau *Thermoplasma acidophilum*. yang kemudian dinamakan sebagai liposom EPC-TEL2,5, belum pernah diuji stabilitasnya. Pada penelitian ini digunakan TEL dari *Thermoplasma acidophilum*. Kestabilan liposom dalam membawa obat hingga mencapai organ sasaran akan sangat menentukan dosis terapi obat. Uji kestabilan liposom EPC-TEL2,5 dilakukan pada liposom tanpa perlakuan (tanpa ekstrusi atau sonikasi), liposom hasil ekstrusi membran 200 nm, dan liposom hasil sonikasi. Secara fisik, uji dilakukan dengan cara mengukur jumlah dan diameter partikel liposom setelah penyimpanan pada suhu 4° C, suhu kamar, dan 37° C. Secara kimia dengan mengukur jumlah dan diameter partikel liposom setelah pemaparan garam NaCl; CaCl₂; MgCl₂ pada pH 5; 7; 9. Pengukuran jumlah dan diameter partikel liposom ke dua jenis uji stabilitas dilakukan pada hari I; hari VII; akhir bulan I; bulan II, dan bulan III. Secara biologik dilakukan pengukuran hasil degradasi TEL pada menit ke 0; 30; 60; jam ke 2; 4; dan 8 setelah penyuntikan liposom **EPC-TEL2,5** secara IP, pada mencit. Hasil uji menunjukkan bahwa liposom tampak stabil hingga akhir bulan I pada suhu 4° C dan 37° C pada uji stabilitas fisik; tetap stabil hingga akhir bulan II pada uji stabilitas kimia pada larutan garam NaCl; CaCl₂ pada pH 5 dan 7. Liposom EPC-TEL2,5 terdegradasi di hepar mencit pada uji stabilitas biologik.

Abstract

The Physical, Chemical, and the Biological stability test on Liposome EPC-TEL 2.5 as the newest drug delivery systems (drug carrier), in vitro and in vivo. This experiment is carried out in order to improve the stability of the Liposome EPC-TEL 2.5 physically, chemically, and biologically. As a new formula, this liposome that has contained phosphatidylcholine from egg yolk=EPC and Tetra-ether Lipid (TEL) from membrane of *Sulfolobus acidocaldarius* or *Thermoplasma acidophilum* had never been tested on their stability. The stability of liposome to carry the drug into the targeted cells or organs is required for determining the therapeutic dose of the drugs. Physically, the test was done by measuring the amount and diameter of liposome after incubating at 4° C, at room temperature, and 37° C. Chemically, the test was also done using the same parameters after introduction of chemical solution of NaCl, CaCl₂; MgCl₂ at the pH of 5; 7; 9. The measurements was carried out on day 1; 7; and month 1; 2; and 3. Biologically, liposome EPC-TEL 2.5 was injected Intra-Peritoneally to mice to detect the degradation of TEL in their liver, at the minute of 0; 30; 60; the hour of 2; 4; and 8. The results of these tests were shown that liposome EPC-TEL 2.5 was stable until the last month of 1 at 4° C and 37° C on physical stability test; more stable at the chemical solution of NaCl and CaCl₂ at the pH of 5 and 7 until two months; and TEL was degradable in liver of mice.

Keywords: liposome, EPC-TEL2.5, stability, nanotechnology

1. Pendahuluan

Dewasa ini, beberapa penyakit serius misalnya kanker dan gangguan imunologik menjadi perhatian para ahli

untuk terus diteliti dengan upaya mendapatkan obat yang aman dan lebih efektif dengan efek samping yang seminimal mungkin. Hal ini disebabkan karena obat antikanker ataupun imunosupresan yang tersedia masih

banyak menimbulkan efek samping dibandingkan manfaat obat karena dibutuhkan dosis tinggi untuk jangka pemberian yang cukup lama¹. Salah satu cara menurunkan efek samping tersebut adalah dengan menginkorporasikan obat antikanker ataupun immunosupresan ke dalam pembawa obat (*drug carrier*) yang telah banyak diteliti yaitu liposom²⁻⁴.

Liposom yang mempunyai gambaran mirip dengan sel yang bermembran dua lapis fosfolipid, merupakan suatu pembawa obat. Liposom umumnya dibuat dari lesitin atau fosfatidilkolin dari kedelai (*Soya bean Phosphatidylcholine/SPC*) atau dari kuning telur (*Egg-yolk Phosphatidylcholine/EPC*)⁵. Selain fosfatidilkolin sebagai lipid utama, liposom dapat juga dibuat kombinasi dengan lipid lain untuk meningkatkan stabilitas liposom, misalnya kolesterol atau tetra eter lipid (TEL)⁶⁻⁸.

Tetra eter lipid merupakan lipid membran bakteri Archaea yang akhir-akhir ini banyak diteliti sebagai lipid utama pada formulasi liposom per oral, karena stabil pada pH 2. Bakteri Archaea yang sudah banyak diekstrak untuk mendapatkan TEL adalah *Thermoplasma acidophilum*⁷ dan *Sulfolobus acidocaldarius*⁸. Pada penelitian ini digunakan TEL dari *Thermoplasma acidophilum*.

Liposom kombinasi EPC-TEL 2,5 terbukti dapat mengikat obat lebih baik dibandingkan liposom EPC atau liposom jenis lain⁹⁻¹⁰, namun belum pernah dilakukan uji stabilitas liposom EPC-TEL 2,5 terhadap pengaruh fisik (perbedaan suhu), pengaruh bahan kimia yaitu NaCl, MgCl₂ dan CaCl₂ pada berbagai pH dan pengaruh metabolisme di hepar pada uji stabilitas biologik.

Apabila liposom EPC-TEL 2,5 cukup stabil pada uji stabilitas fisik dan kimia, tidak stabil pada uji stabilitas biologik, maka formulasi terbaru liposom tersebut dapat dimanfaatkan untuk menginkorporasikan obat-obat, terutama obat yang hanya efektif pada dosis tinggi ataupun obat-obat untuk jangka panjang, sehingga efek toksik obat dapat ditekan serendah mungkin.

2. Metode Penelitian

Tempat Penelitian: Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran, Departemen Farmakologi, Departemen Biokimia, Departemen Fisika Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Lama Penelitian: 10 bulan, Oktober 2006 – Juli 2007

Tahap 1

Preparasi liposom EPC-TEL2,5 (Ernie HP)¹⁰

- Liposom diekstrusi dengan ekstruder Avestin®, membran berpori 100 dan 200 nm → liposom unilamellar berukuran 100-200 nanometer).

- Liposom sonikasi (*bath sonicator*) → unilamellar berukuran <100 nm.

Tahap II

Uji stabilitas *in vitro* :

A. Fisik: pengukuran besar partikel dan jumlah liposom EPC-TEL2,5 :

- 4 kelompok : 1) sebelum ekstrusi; 2) ekstrusi 200 nm; 3) ekstrusi 100 nm; 4) sonikasi
- Setiap kelompok dibagi ke dalam 3 subkelompok observasi suhu inkubasi (4 sampel/subkel.) + penanda liposom Quinacrin 0.05 %: suhu kamar ($\geq 20^{\circ}C$), suhu $37^{\circ}C$ dan $4^{\circ}C$.
- Observasi hari pertama, akhir minggu pertama, akhir bulan I, akhir bulan ke II dan akhir bulan ke III (3 bulan).
- Pengukuran :
 - a. Metode van Renswoude, dkk¹¹ : modifikasi elektroforesis untuk mengukur besar liposom.
 - b. Modifikasi mikroskop fluoresens untuk mengukur besar (diameter dengan skala Olympus) dan jumlah liposom.

B. Kimiawi (Metode Freisleben HJ, dkk¹² dan New RC, dkk¹³).

- 4 kelompok : 1) sebelum ekstrusi; 2) ekstrusi 200 nm; 3) ekstrusi 100 nm; 4) sonikasi
- Setiap kelompok dibagi ke dalam 2 subkelompok: 150 dan 350 mMol + penanda liposom Quinacrin 0,05 %.
- Masing-masing subkelompok dibagi 3 sub-subkelompok elektrolit NaCl, MgCl₂, CaCl₂ dengan pH masing-masing 5; 7; dan 9, 3 sampel/sub-sub kelompok.
- Uji pada hari I → akhir minggu I, akhir bulan I, akhir bulan ke 2, dan akhir bulan ke 3 penyimpanan pada suhu $4^{\circ}C$
- Pengukuran:
 - a. Metode van Renswoude, dkk¹¹ : modifikasi elektroforesis untuk mengukur besar liposom
 - b. Modifikasi mikroskop fluoresens untuk mengukur besar (diameter, skala Olympus) dan jumlah liposom

C. Uji stabilitas biologik *in vivo*:

Untuk menilai dekomposisi (degradasi) TEL murni dan atau EPC-TEL2,5 dengan cara:

- 24 ekor mencit C3H jantan dan betina 12-15 minggu, 20-25 g, dibagi 6 kelompok ekstraksi hepar pada menit ke 0; 30; 60; dan jam 2; 4; dan 8.
- Dosis liposom EPC-TEL 2,5 sebesar 10 mmol /ekor, IP
- Ekstrak hepar disimpan pada suhu $4^{\circ}C$ sebelum semua ekstrak terkumpul.

- Hasil dekomposisi TEL diukur dengan TLC- gel silika60 F254 (Merck) dengan kontrol TEL murni pada dosis 200; 300; 400 ug.
- Pewarna bercak campuran tembaga asetat 3% dan asam fosfat 8% dengan pemanasan 180° C selama 10 menit.
- Bercak di"scan" dengan program Presto Page Manager dan kadar TEL/degradasi diukur semi kuantitatif pada program Adobe Photo Shop 7.01

3. Hasil dan Pembahasan

Telah dilakukan pembuatan liposom EPC-TEL 2,5 dan uji stabilitas kimia (NaCl dan MgCl₂ 350 mmol) pada gel sepharose untuk mengukur besar liposom

Dari hasil penelitian awal disimpulkan bahwa:

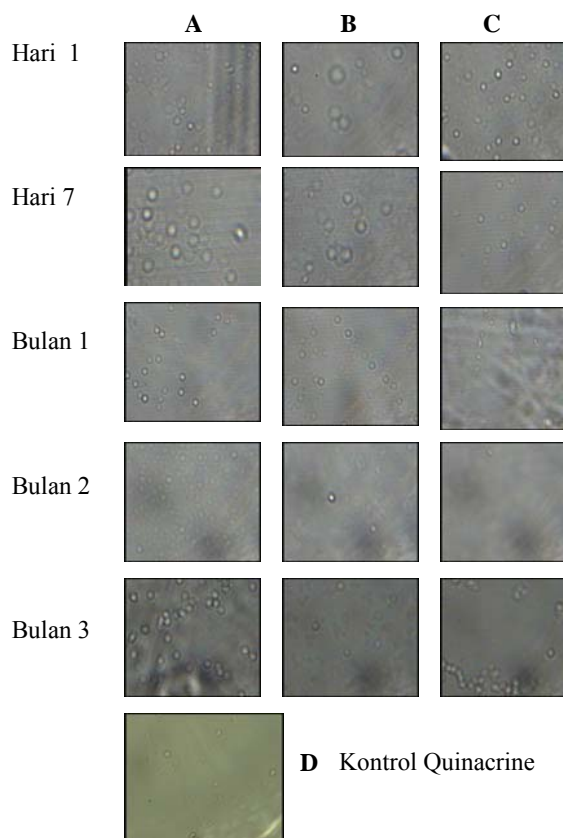
- Faktor retensi (Rf) sampel 2-9 : 1,7 -1,9 → tidak ada perbedaan besar / ukuran partikel liposom tanpa atau dengan ekstrusi dan sonikasi
- Minggu 1 dan ke 4 → tidak ada perbedaan ukuran partikel liposom (Rf: sama)
- Dengan mikroskop fluoresens → ukuran partikel tidak berubah yaitu berkisar 100 nm (data tidak dapat dipublikasikan)
- Pada akhir minggu ke 8 → liposom tanpa bahan kimia tampak cenderung bergerombol

Berdasarkan hasil penelitian awal tersebut yaitu bahwa:

- Rf hasil ekstrusi 100 nm dan 200 nm sama, maka ekstrusi dengan membran 100 nm tidak dilanjutkan
- Pengukuran besar (diameter) dan jumlah liposom digunakan modifikasi mikroskop fluoresens (hasil inovasi Dep. Fisika FKUI)

Hasil Uji Stabilitas Fisik menunjukkan bahwa jumlah dan diameter liposom EPC-TEL 2,5 tampak tetap stabil hingga akhir bulan I terutama pada suhu 4°C dan 37°C (p<0,000; hasil uji statistik tidak ditampilkan). Dalam naskah ini hanya ditampilkan gambaran liposom pada suhu 37°C, hasil ekstrusi 200 nm dan sonikasi dibandingkan dengan liposom tanpa perlakuan (tanpa ekstrusi/sonikasi). Lihat Gambar 1.

Pada uji stabilitas kimia menunjukkan hasil bahwa larutan NaCl dan CaCl₂ pada pH 5 dan 7, terutama larutan kimia 350 mMol tampak tetap stabil dan berbeda bermakna dibandingkan dengan larutan yang sama pada pH 9 dan dengan larutan MgCl₂ pada berbagai pH terutama pada liposom hasil sonikasi (p<0,000; hasil analisis statistik tidak ditampilkan). Hasil uji hanya ditampilkan pada pH 7, lihat Gambar 2 dan 3.

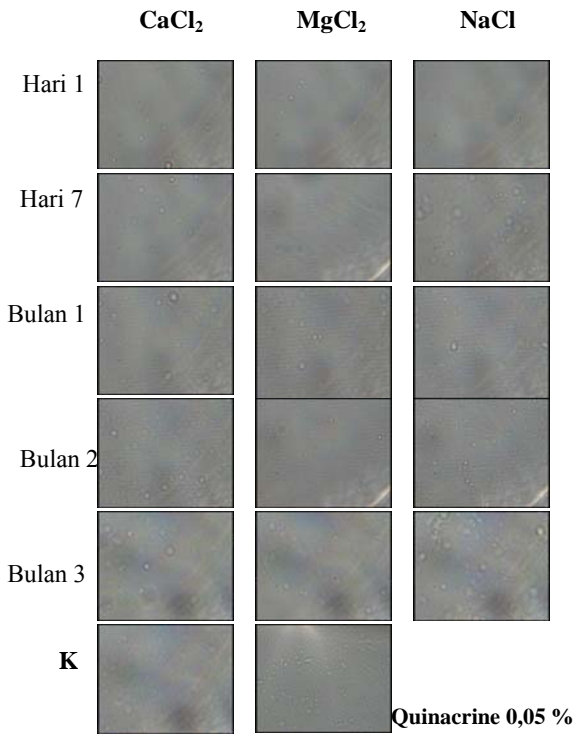


Gambar 1. Gambaran liposom pada uji stabilitas fisika, suhu 37°C, pembesaran 400 X (A. Hasil sonikasi; B. Hasil ekstrusi 200 nm; C. Kontrol tanpa perlakuan; D. Lar. Quinacrine 0,05%).

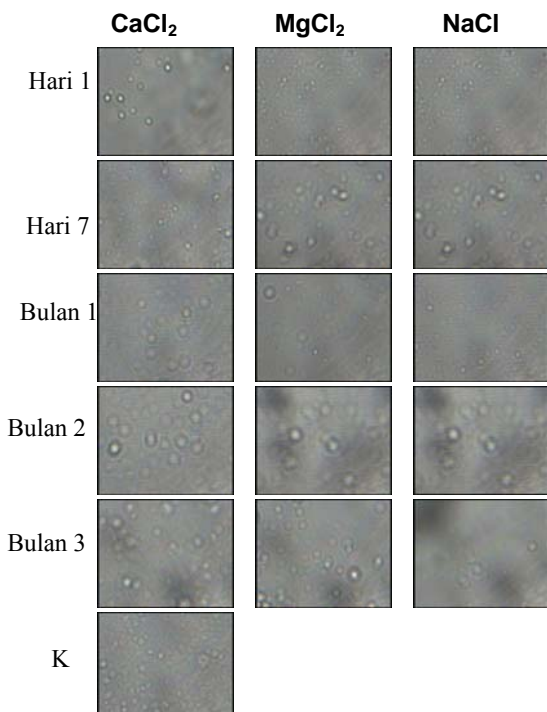
Hasil uji stabilitas biologik menunjukkan bahwa TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 tidak terdeteksi pada seluruh waktu pengambilan sampel (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa TEL didegradasi oleh hati. Hasil ini didukung pula bahwa secara eks vivo, ekstrak hati mencit yang ditambah dengan liposom EPC-TEL 2,5 tidak tampak adanya TEL pada TLC (K+TEL).

Hasil uji stabilitas fisik menunjukkan bahwa liposom EPC-TEL 2,5 tampak stabil hingga akhir bulan I pada suhu 4° C dan 37° C, sedangkan uji stabilitas kimia tampak stabil hingga akhir bulan II, terutama dalam larutan NaCl dan CaCl₂ pada pH 5 dan 7. Hasil ini agak mirip dengan liposom TEL (tetra eter lipid) murni (Freisleben¹²) yang terbukti stabil hingga 3 bulan penyimpanan pada suhu 4° C.

Jumlah liposom EPC-TEL 2,5 tampak berkurang pada akhir bulan ke 3 karena sebagian bergumpal, sedangkan diameter relatif tetap (analisis statistik tidak ditampilkan).

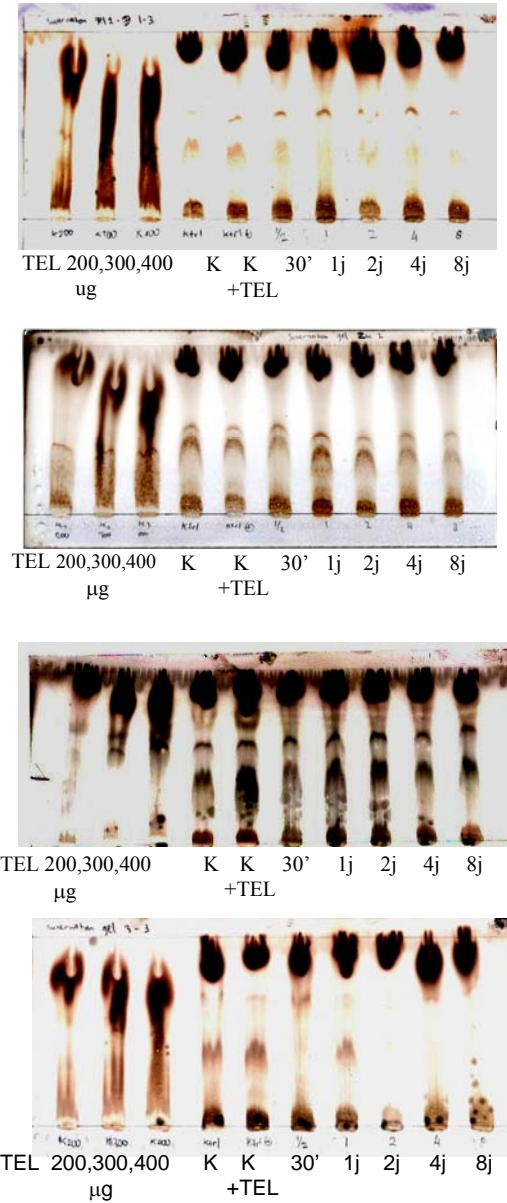


Gambar 2. Gambaran liposom hasil sonikasi pada uji stabilitas kimia 150 mMol, pH 7, pembesaran 400 X. (K: kontrol tanpa perlakuan)



Gambar 3. Gambaran liposom hasil sonikasi pada uji stabilitas kimia 350 mMol, pH 7, pembesaran 400 X (K: kontrol tanpa perlakuan)

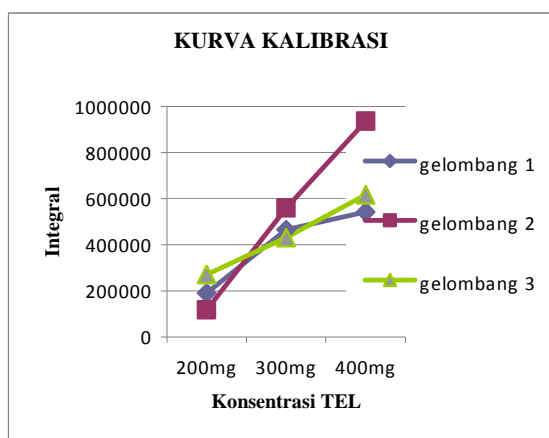
Hasil Uji Stabilitas Biologik



Gambar 4. Hasil degradasi TEL di liver (hati) mencit setelah penyuntikan liposom EPC-TEL 2,5: 10 mMol, IP

Perhitungan jumlah dan pengukuran diameter liposom tetap dapat dilakukan walaupun secara manual → lebih murah karena peralatan untuk pengukuran tersebut sangat mahal.

Gambaran liposom cukup jelas tanpa mikroskop fluoresens → mirip dengan hasil pemeriksaan oleh van Renswoude, dkk¹¹. Data terekam dengan inovasi mikroskop oleh staf Dep. Fisika FKUI.



Gambar 5. Kurva kalibrasi TEL murni sebagai kontrol pada pengukuran degradasi TEL di hati mencit

Deteksi liposom menggunakan zat fluoresens (Quinacrine) yang lazim digunakan di Dep. Biologi FKUI → lebih murah dan mudah didapat. TEL pada penelitian ini merupakan lipid dari *Thermoplasma acidophilum* sesuai penelitian Freisleben 3, tetapi hasil stabilitas biologik mirip dengan hasil penelitian Ernie⁹ yang menggunakan TEL dari *Sulfolobus acidophilus* pada uji distribusi liposom.

4. Kesimpulan dan Saran

- Liposom EPC-TEL 2,5 cukup stabil hingga 1 bulan penyimpanan secara fisik, terutama pada suhu 4° dan 37° C, sedangkan secara kimia terutama NaCl, CaCl₂ dalam larutan 350 mMol tetap stabil hingga akhir bulan II, pada pH 5 dan 7.
- Liposom EPC-TEL 2,5 tidak stabil pada uji stabilitas biologik → terdegradasi di hati mencit, namun tidak / belum diketahui hasil degradasi TEL

Saran:

- Diperlukan inovasi peralatan pengukuran diameter dan perhitungan jumlah liposom yang lebih akurat,
- Diperlukan uji degradasi lebih lanjut untuk mengetahui hasil degradasi / metabolisme TEL.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada Pimpinan dan Staf Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Universitas Indonesia (DRPM UI) yang telah mendanai penelitian ini. Terima kasih saya sampaikan untuk para pembimbing mahasiswa Dra. Ida Hafiz, Apt.MSi; dr. Siti Farida, MKes; Drs. Yulhasri, MBIomed; serta anak-anakku mahasiswa FKUI angkatan 2005-2006: Lisa, Bhisma, Eki, Prima, Vania, Nina, Nelfi, Yenni, Venesa, Widya, Rachma,

Wendy, Aditya, Dwi, Satrio, Dorthea, Agung, Angga, Wahyu, Fatimah, Yani.

Daftar Acuan

- Chabner BA Ryan DP, Paz-Ares L, Garcia-Carbonero R, Calabresi P. Antineoplastic agents. In : Hardman JG, Limbird LE (eds). Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed. Maxwell Macmillan Int. Edition 2001: 1389-1459.
- Lasic DD.(ed). Liposomes as a drug delivery system *Liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993:265-324.
- Freise CE, Liu T, Hong K, et al. The increased efficacy and decreased nephrotoxicity of cyclosporine liposome. *Transplantation* 1994;579(6):928-32.
- 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.
- Lasic DD(ed.). Chemistry of lipids and liposomes. In : : *Liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993: 1-42.
- New RRC. Preparation of liposomes. In: New RRC (ed.). *Liposomes. A Practical approach*. IRL Press 1991: 33-104.
- Freisleben HJ, Antonopoulos E, Rothe U, Bakowsky U. Tetraetherlipide und diese enthaltende liposome sowie deren verwendung. Patents: P 19607722.2, 1996; PCT/EP 97/01011, 1997.
- Sugai A, Sakuma R, Fukuda I, Kurosawa N, Itoh YH, Kon K, Ando S, Itoh T. The structure of the core polyol of the ether lipids from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Lipids* 1995;30(4):339-44.
- Purwaningsih EH, Freisleben HJ, Sadikin M. Peningkatan inkorporasi metilprednisolon 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.
- Purwaningsih EH, Sadikin M, Soeradi O, Rasad A, Freisleben HJ. Distribusi liposomal-metilprednisolon palmitat (L-MPLP) pada beberapa organ mencit setelah pemberian intraperitoneal. *Makara. Seri Kesehatan* 2004;2(8):65-72.
- Van Renswoude AJBM, Blumenthal R, Weinstein JN. Thin-layer chromatography with agarose gels. A quick, simple method for evaluating liposome size. *Biochim Biophys Acta* 1980;595:151-6.
- Freisleben HJ. The mainphospholipid of the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. Does the Liposome Technology with this unique Tetraether lipid provide novel perspectives for Biochemistry and Medicine? (Title translated from

German to English). Habilitation at Johann-Wolfgang, Goethe-University, Frankfurt am Main, 1992.

13. New RRC. Characterization of liposomes. In: New RRC (ed.). *Liposomes. A Practical Approach*. IRL Press 1991: 105-61