

PENINGKATAN POTENSI SEDIAAN METIL PREDNISOLON PALMITAT SETELAH INKORPORASI DENGAN LIPOSOM, SUATU STUDI EFEK ANTIINFLAMASI PADA KULTUR SPLENOSIT MENCIT

Wawaimuli Arozal¹, F.D. Suyatna¹, Ernie H. Purwaningsih², Hedi R. Dewoto²

1. Departemen Farmakologi dan Teurapeutik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

2. Departemen Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

Abstrak

Ruang lingkup dan metodologi: Glukokortikoid telah lama digunakan sebagai antiinflamasi dan immunosuppresan. Penggunaan yang panjang dengan dosis tinggi menyebabkan efek samping yang cukup serius. Dewasa ini telah dikembangkan berbagai pembawa obat yang dapat membawa obat langsung ke target obat atau ke reseptornya. Dengan menginkorporasikan obat ke pembawa obat, contohnya liposom, efek samping sistemik dapat ditekan. Purwaningsih dkk telah berhasil membuat sediaan baru yakni Liposom-metilprednisolon palmitat (L-MPLP). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek farmakologi dari L-MPLP, terutama efek antiinflamasinya. Parameter yang dilihat adalah penurunan produksi interferon gamma pada kultur limfosit T setelah distimulasi dengan concanavalin A secara in vitro maupun in vivo. Hasil dan Kesimpulan : Terjadi penurunan kadar interferon gamma setelah pemberian L-MPLP secara in vivo pada dosis 2, 8 dan 16 mg/kgBB secara signifikan dibandingkan kontrol tanpa perlakuan sedangkan pemberian MPL tidak terjadi penurunan kadar interferon gamma. Pada kultur in vitro, pemberian L-MPLP maupun MPL pada kadar 5.10^{-1} , 5.10^{-2} dan 5.10^{-3} keduanya mampu menekan produksi interferon gamma, dimana penekanan oleh L-MPLP lebih baik dibanding MPL secara signifikan.

Abstract

The Improving of Methylprednisolone Palmitate Potency After Incorporated With Liposome. An Antiinflammation Study In Culture Of Mice's Splenocytes. Glucocorticoid has been used as an antiinflammatory and immuno-suppressive drug. Longterm utilisation at high dose of glucocorticoid is associated with serious side effects. In recent years, many attempts have been performed in searching the appropriate vehicles to deliver the drug directly into the target organ or the receptor. By incorporating the drug into its vehicle such as liposome, the systemic side effect can be minimized. Purwaningsih et al has successfully synthesized a novel preparation of liposome methylprednisolone palmitate (L-MPLP). The aim of the study was to learn the pharmacological effect of L-MPLP, especially on antiinflammatory effect of this novel preparation, compared with the standard methylprednisolone (MPL). The parameter was the potency of L-MPLP in reducing gamma-interferon production in T-lymphocyte culture after stimulation with concanavalin A in vitro as well as in vivo. Gamma-interferon was assayed by ELISA method. The reduction of gamma interferon, in vivo, after the administration of L-MPLP at the dose of 2,8 and 16 mg/kgBW respectively, showed significant difference than a control group, while MPL did not. The addition of both L-MPLP and MPL in in vitro culture at the concentration of 5.10^{-3} , 5.10^{-2} and 5.10^{-1} mM have proved to suppress the gamma-interferon production, where the suppression of L-MPLP was more effective than MPL, significantly.

Keywords: antiinflammation, gamma interferon, liposome-methylprednisolone palmitate

1. Pendahuluan

Metilprednisolon seperti glukokortikoid lainnya, memiliki efek immunosupresif dan efek antiinflamasi yang cukup poten. Sebagai antiinflamasi, metilprednisolon diindikasikan untuk cedera spinal akut, episode akut penyakit multiple sclerosis, neuritis optik, penyakit Crhon's, udem serebral dan spinal, *systemic*

lupus erythematosus (SLE), serta eksaserbasi akut pada asma. Untuk penyakit Crohn misalnya, metilprednisolon diberikan pada dosis 48 mg/hari selama paling sedikit 6 minggu dan setelah itu harus dilakukan penurunan dosis secara *tapering off*^{1,2,3}.

Metilprednisolon seperti umumnya glukokortikoid lain, juga memiliki efek samping, terutama pada pemberian

jangka panjang dan dosis yang besar. Dengan menginkorporasikan MPLP, suatu senyawa baru hasil sintesis MPL dengan gugus palmitat ke dalam liposom sebagai pembawa obat, diharapkan sediaan baru tersebut (L-MPLP) dapat diarahkan, agar dapat langsung mencapai sel sasaran. Senyawa baru tersebut diupayakan agar dapat dimanfaatkan dalam bidang terapeutic dengan harapan, akan lebih efektif dan lebih efisien dari segi dosis, frekuensi pemberian dan jangka waktu pemberian dibandingkan dengan obat standar metilprednisolon (MPL)⁴.

Penelitian dibawah ini bertujuan untuk membuktikan aspek farmakodinamik L-MPLP sebagai senyawa baru, yaitu perubahan kadar interferon gamma (IFN γ) secara in vitro dan in vivo pada mencit jantan galur C3H, dibandingkan dengan obat standar metilprednisolon sodium suksinat (MPL). Interferon gamma adalah salah satu mediator inflamasi yang sintesisnya dihambat oleh glukokortikoid^{7,8,10}. Dengan menilai penekan kadar interferon gamma dapat diketahui, apakah senyawa baru ini juga memiliki aktivitas biologik.

Alasan sitokin interferon gamma dipilih pada penelitian ini, karena sitokin ini memiliki peranan yang besar dalam regulasi sistem imun dan kemampuannya untuk mengaktifkan makrofag, sel granulosit dan sel endotel yang berperan dalam proses peradangan yang merupakan target dari obat golongan steroid^{7,8,9}.

2. Metode Penelitian

Pembuatan kultur limfosit dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi FKUI/RSUPNCM. Perhitungan jumlah interferon gamma dilakukan dengan menggunakan microplate reader ELISA di laboratorium Parasitologi FKUI/RSUPNCM. Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit jantan galur C3H yang diperoleh dari laboratorium eksperimental Bagian Patologi Anatomi FKUI/RSUPNCM. Hewan berumur 12-16 minggu dengan berat 16 – 20 gram.

Reagensia: Natrium bikarbonat (ICN Flow), Gentamicin (Gibco), Fungizone (Gibco), MPL (Solumedrol[®], Upjohn), L-MPLP, Liposom, RPMI 1640 pH 7,2 – 7,4 (Gibco), Fetal bovine serum (ICN Flow), Concanavalin A (Sigma), Nylon wool (Biotest), Nylon mesh, Kit Quantikine mouse IFN γ immunoassay (R&D), Akuamili Q, Akuabides, Alkohol 70%, dietileter, Gas CO₂ (Perum aneka gas), Kapas steril

Penelitian ini dilakukan menggunakan pola percobaan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 macam senyawa (dapar Tris, MPL, L-MPLP dan Liposom) dengan 8 macam dosis perlakuan. Jumlah ulangan untuk setiap perlakuan ditentukan dengan menggunakan rumus Federer, yaitu 5 ekor mencit untuk setiap kelompok. Masing masing kelompok terdiri atas 5 ekor

hewan coba, yang dikelompokkan secara acak dari 40 ekor. Penentuan dosis dilakukan atas penelitian yang dilakukan Mishina dkk¹⁰, dengan rincian sbb.:

Kelompok kontrol (dapar Tris)

Kelompok MPL1; dosis 8 mg/kgBB

Kelompok MPL2; dosis 16 mg/kgBB

Kelompok MPL; dosis 32 mg/kgBB

Kelompok L-MPLP; dosis 2 mg/kgBB

Kelompok L-MPLP; dosis 8 mg/kgBB

Kelompok L-MPLP; dosis 16 mg/kgBB

Kelompok Liposom; 5,125 mM

Preparasi sel limfosit dari jaringan limpa (splenosit)¹¹. Obat disuntikkan secara intravena lewat vena ekor, sesuai pembagian kelompok. Empat puluh delapan jam kemudian, hewan dibunuh dengan cara dekapitasi dan kemudian, secara steril diambil limpanya. Sedangkan untuk pemeriksaan in vitro, limpa diambil dari mencit lain tanpa perlakuan. Limpa yang diperoleh, diletakkan pada cawan steril yang berisi 5 ml medium bebas serum. Untuk mendapatkan suspensi sel limfosit, sel dilewatkan pada *nylon net* steril, sedangkan untuk melisiskan eritrosit, ditambahkan amonium klorida ke dalam tabung steril yang berisi suspensi sel.

Jumlah limfosit T diperkaya dengan cara, melewati suspensi sel pada kolom *nylon wool*. Sebelum digunakan, *nylon wool* diceraiberaikan dengan pinset dan diisikan ke dalam *syringe plastic polietilen*. Setiap 0,6 gr *nylon wool* diisikan ke dalam *syringe* 10 ml sebagai kolom untuk suspensi sel limpa atau 0,3 gr *nylon wool* diisikan pada *syringe* 5 ml sebagai kolom untuk suspensi sel limpa. Pengisian dilakukan dengan bantuan penekanan moderat dan diikuti pelepasan piston secara perlahan lahan. Kolom, piston dan jarum *syringe* disterilisasi dalam otoklaf. Ke dalam kolom terlebih dahulu dipreinkubasi dengan medium RPMI 1640 yang mengandung 5 % *foetal bovine serum* (FBS) sebanyak \pm 2 kali volume *syringe*. Suspensi sel diresuspensi untuk mendapatkan jumlah sel sebesar 5.10^6 sel/ml. Suspensi sel ditetaskan melalui kolom dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. limfosit yang tidak terikat pada kolom dielusi, yaitu dengan menambahkan medium pada kolom sebanyak satu kali volume *syringe*. Eluan limfosit T ini dicuci 2 kali dengan cara disentrifugasi pada 200 g selama 5 menit. Suspensi sel diencerkan lagi untuk memperoleh jumlah sel sebesar 10^6 /ml. Sel yang diperoleh tersebut dikultur dalam medium yang mengandung FBS dan mitogen concanavalin A 2,5 μ g/ml selama 48 jam. Untuk kultur *in vitro*, ke dalam suspensi sel tersebut masing masing ditambahkan L-MPLP dengan kadar 5.10^{-1} mM, 5.10^{-2} mM dan 5.10^{-3} mM; liposom dan tris sebagai kontrol. Medium kultur yang digunakan sama dengan percobaan in vivo. Etelah 48 jam, medium tersebut disentrifugasi pada 600 g selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil untuk kemudian disimpan pada suhu -20°C sebelum dilakukan pengukuran kadar IFN γ .

Perhitungan kadar IFN γ dengan metode ELISA (kit Quantikine). Untuk persiapan, dilakukan pengenceran standar dan kontrol dalam kit yang tersedia. Pada tiap sumur dimasukkan 50 μ l *assay diluent*, kemudian ditambahkan 50 μ l obat standar, kontrol atau sampel. Inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar, kemudian dicuci dengan dapar pencuci sebanyak lima kali. Selanjutnya, tambahkan 100 μ l *mouse IFN γ* dan diinkubasi lagi selama 2 jam pada suhu kamar. Sediaan dicuci ulang sebanyak 5 kali, kemudian tambahkan 100 μ l *substrat solution* dan dihindarkan kontak dengan cahaya dan diinkubasi lagi selama 30 menit. Terakhir, tambahkan 100 μ l *stop solution* dan kemudian segera diukur dengan *microplate reader* ELISA pada panjang gelombang 450 nm.

Analisa Statistik. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji Anova satu arah. Setelah uji normalitas dan homogenitas untuk kelompok yang memiliki perbedaan yang bermakna pada uji Anova dilanjutkan dengan uji kemaknaan berganda Tukey. Batas kemaknaan (α) adalah 5 % atau $p < 0,05$.

Kadar Interferon Gamma Kultur *In Vivo*. Kadar interferon γ yang dihasilkan dari kultur limfosit T secara *in vivo* setelah distimulasi dengan concanavalin A, diukur dengan metode ELISA. Hasil yang diperoleh

berupa absorbansi yang dibaca pada panjang gelombang 450 nm, dibandingkan dan diukur menggunakan kurva kalibrasi yang telah dibuat sebelumnya.

Pada Tabel 1 dan Gambar 1 diperlihatkan, bahwa tidak terjadi penekanan produksi interferon γ yang bermakna secara statistik pada kelompok liposom pada maupun pada ke tiga kelompok MPL bila dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan, pada ke tiga kelompok yang mendapat LMPLP, terdapat perbedaan bermakna secara statistik bila dibandingkan kontrol.

Pada Tabel 2 diperlihatkan persentase kadar interferon γ tiap tiap kelompok dibandingkan kontrol. Terlihat bahwa tidak ada hambatan produksi IFN γ pada kelompok MPL, sedangkan pada kelompok L-MPLP terlihat adanya hambatan produksi IFN γ . Dengan peningkatan dosis L-MPLP, hambatan produksi semakin besar.

Dari Tabel 2 terlihat, bahwa kadar IFN γ yang terbentuk pada pemberian L-MPLP dengan dosis 8 mg/kgBB menghasilkan kadar 1,8 kali lebih rendah dibanding MPL dosis yang sama. Sedangkan pemberian L-MPLP dosis 16 mg/kgBB menghasilkan kadar IFN γ 2,5 kali lebih rendah dibandingkan MPL pada dosis yang sama.

Tabel 1. Kadar interferon γ hasil kultur secara *in vivo*

No.	Kontrol (pg/ml)	MPL 1 (pg/ml)	MPL2 (pg/ml)	MPL3 (pg/ml)	LMPLP1 (pg/ml)	LMPLP2 (pg/ml)	LMPLP3 (pg/ml)	Liposom (pg/ml)
1.	113.5	113.7	116.2	112.6	90.45	64.45	46.3	130.6
2.	126.9	126.5	125.5	121.6	105.56	83.45	60.8	112.3
3.	118.5	120.6	113.8	115.7	93.48	61.25	45.6	96.6
4.	106.5	107.5	104.6	101.9	82.64	46.45	44.9	113.9
5.	115.8	114.3	112.8	114.0	91.46	65.24	31.0	112.6
Rata rata \pm SD	116.24 \pm 7.44	116.52 \pm 7.25	114.58 \pm 7.51	113.16 \pm 7.16	92.71 * \pm 8.27	64.16 *# \pm 13.2	45.70 * \circ \pm 10.56	113.2 \pm 12.04

Keterangan :

Kelompok kontrol (dapar Tris)

Kelompok MPL1; dosis 8 mg/kgBB

Kelompok MPL2; dosis 16 mg/kgBB

Kelompok MPL; dosis 32 mg/kgBB

Kelompok L-MPLP; dosis 2 mg/kgBB

Kelompok L-MPLP; dosis 8 mg/kgBB

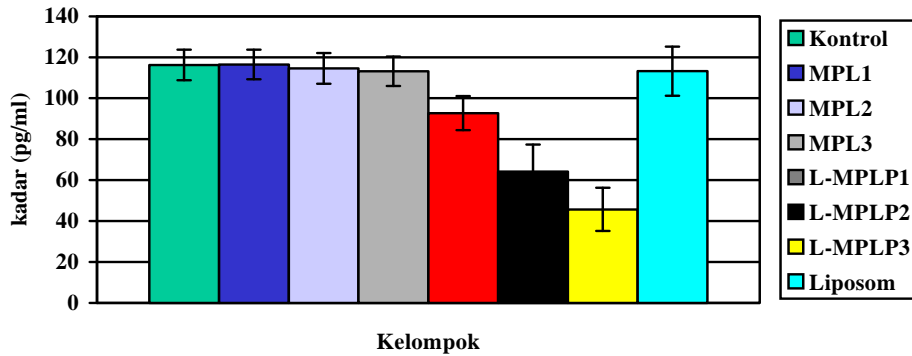
Kelompok L-MPLP; dosis 16 mg/kgBB

Kelompok Liposom; 5,125 mM

* $p < 0,05$ dibandingkan kontrol

$p < 0,05$ dibandingkan MPL 1

\circ $p < 0,05$ dibandingkan MPL 2



Gambar 1. Grafik rata-rata kadar interferon γ hasil kultru *in vivo*

Tabel 2. Kadar IFN γ hasil kultur *in vivo* dari tiap-tiap kelompok dosis dibandingkan kontrol

	Kontrol	MPL 1	MPL 2	MPL 3	LMPLP1	LMPLP2	LMPLP3	Liposom
Kadar IFN (pg/ml)	116.24 ± 7.44	116.52 ± 7.25	114.58 ± 7.51	113.16 ± 7.17	92.71 ± 8.27	64.16 ± 13.18	45.69 ± 10.56	113.2 ± 12.04
Kadar (%)	100	100	98.57	97.35	79.75	55.2	39	97.3

3. Hasil dan Pembahasan

Kadar Interferon Gamma Hasil Kultur Secara *In Vitro*. Kadar interferon γ yang dihasilkan dari kultur limfosit T secara *in vitro* setelah distimulasi dengan concanavalin A, diukur dengan metode ELISA. Hasil yang diperoleh berupa absorbansi yang dibaca pada panjang gelombang 450 nm. Hasil pengukuran dibandingkan dengan kurva kalibrasi yang telah dibuat sebelumnya.

Pada Tabel 3 dan Gambar 1 dapat dilihat, bahwa penekanan produksi interferon γ baik pada ke tiga kelompok pemberian MPL maupun ke tiga kelompok L-MPLP, sedangkan pada kelompok liposom, tidak terjadi penekanan. Secara statistik, terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok MPL maupun L-MPLP.

Pada Tabel 4 diperlihatkan persentase penekanan produksi interferon γ dibandingkan terhadap kontrol, yaitu bahwa persentase penekanan pada kelompok L-MPLP lebih baik dari kelompok MPL. Dengan peningkatan dosis, baik MPL maupun L-MPLP, persentase penekanan tampak semakin besar.

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah mengukur kadar interferon gamma yang dihasilkan dari kultur limfosit T secara *in vitro* dan *in vivo*, yang

distimulasi oleh mitogen concanavalin A. Interferon gamma merupakan salah satu sitokin yang dihasilkan oleh limfosit T. Proliferasi limfosit T menyebabkan produksi interferon gamma meningkat, jadi apabila terjadi hambatan pada proliferasi limfosit T, akan menyebabkan penurunan produksi interferon gamma.

Dari Tabel 4 terlihat, bahwa kadar IFN γ yang terbentuk pada pemberian L-MPLP konsentrasi 5×10^{-3} mM menghasilkan kadar IFN γ 1,1 kali lebih besar dibandingkan MPL pada konsentrasi yang sama. Sedangkan pemberian L-MPLP konsentrasi 5×10^{-2} mM menghasilkan kadar IFN γ 1,5 kali lebih kecil dibandingkan MPL pada konsentrasi yang sama. Pemberian L-MPLP konsentrasi 5×10^{-1} mM menghasilkan kadar IFN γ 2 kali lebih kecil dibandingkan MPL pada konsentrasi yang sama.

Proliferasi limfosit diketahui, akan dihambat oleh berbagai serum protein, hormon termasuk glukokortikoid dan beberapa obat. Beberapa mitogen, misalnya concanavalin A, akan meningkatkan proliferasi suatu kultur. Concanavalin A yang merupakan suatu lektin mempunyai tempat ikatan spesifik untuk molekul karbohidrat. Limfosit T, diketahui mempunyai molekul karbohidrat yang berfungsi sebagai reseptor lektin. Concanavalin A akan

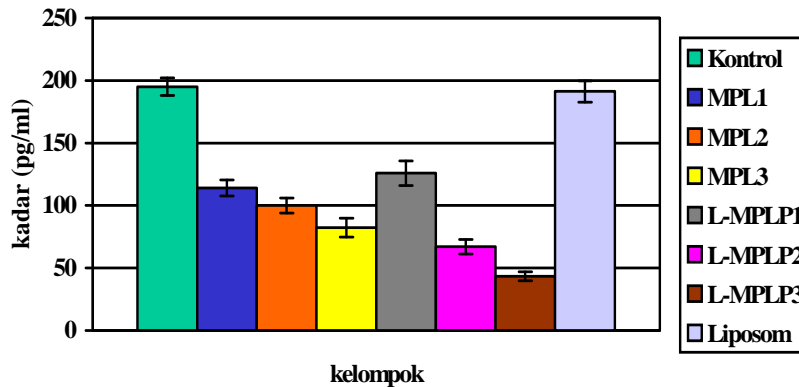
Tabel 3. Kadar interferon γ hasil kultur secara *in vitro*

No.	Kontrol (pg/ml)	MPL1 (pg/ml)	MPL 2 (pg/ml)	MPL 3 (pg/ml)	LMPLP1 (pg/ml)	LMPLP2 (pg/ml)	LMPLP3 (pg/ml)	Liposom (pg/ml)
1.	195.45	115.2	100.5	83.2	122.3	65.8	42.6	185.6
2.	203.7	123.7	91.4	91.4	110.7	69.5	43.6	195.8
3.	196.75	112.8	99.8	84.4	130.8	75.6	47.6	200.1
4.	184.15	106.2	108.5	82.6	155.9	60.5	44.9	179.3
5.	195.23	111.7	99.7	70.6	129.8	63.8	38.2	195.2
Rata rata \pm SD	195.05 \pm 7.01	113.92* \pm 6.38	99.98* \pm 6.05	82.44* \pm 7.49	125.9 * \pm 9.79	67.04*# \pm 5.8	43.4*# \pm 3.45	191.2 \pm 8.51

Keterangan:

- Kelompok kontrol : dapar tris HCL
 Kelompok MPL 1 : metilprednisolon kadar 5. 10-3 mM
 Kelompok MPL 2 : metilprednisolon kadar 5. 10 -2 mM
 Kelompok MPL 3 : metilprednisolon kadar 5. 10 -1 mM
 Kelompok L-MPL P 1 : liposom-metilprednisolon palmitat kadar 5. 10 -3 mM
 Kelompok L-MPLP 2 : liposom-metilprednisolon palmitat kadar 5. 10-1 mM
 Kelompok L-MPLP 3 : liposom-metilprednisolon palmitat kadar 5. 10-1 mM
 Kelompok liposom : 5,125 mM

- * p < 0,05 dibandingkan kontrol
 # p < 0,05 dibandingkan MPL 1
 ° p < 0,05 dibandingkan MPL 2

Gambar 2. Grafik rata-rata kadar interferon γ Tabel 4. Kadar interferon γ hasil kultur secara *in vitro* dari tiap kelompok dosis dibandingkan kontrol (dalam %)

	Kontrol	MPL 1	MPL 2	MPL 3	LMPLP1	LMPLP2	LMPLP3	Liposom
Kadar IFN (pg/ml)	195.05 \pm 7.01	113.92 \pm 6.38	99.98 \pm 6.05	82.44 \pm 7.49	125.9 \pm 9.78	67.04 \pm 5.79	43.4 \pm 3.45	191.20 \pm 8.51
Kadar IFN γ (%)	100	58.40	51.25	42.26	64.54	34.26	22.25	98.02

berikatan dengan limfosit T, selanjutnya akan meningkatkan aktivasi protein tirosin kinase, mengaktifkan fosfolipase C, kemudian menghidrolisis

PiP₂ menjadi diasil gliserol dan IP₃ yang akan mengaktifasi gen untuk proses mitosis.

Pada kultur *in vivo*, ke tiga kelompok MPL yang masing-masing mendapat 8, 16 dan 32 mg/kgBB, kadar interferon gamma masing-masing adalah 116,52 pg/ml, 114,58 pg/ml dan 113,16 pg/ml. Bila dibandingkan dengan kadar kontrol, yakni 116,24 pg/ml ke tiganya tidak memperlihatkan penekanan yang bermakna secara statistik, dengan persentase kadar IFN γ dibandingkan kontrol secara berurutan adalah 100 %, 98,7 % dan 97,35 %. Untuk kelompok liposom, kadarnya adalah 113,2 pg/ml dengan persentase kadar IFN γ sebesar 97,3 %. Hasil ini menunjukkan, baik kelompok MPL maupun liposom tidak mampu menekan proliferasi limfosit. Hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut, yaitu, bahwa waktu paruh MPL adalah 2,3 jam, sedangkan kultur baru dilakukan setelah 48 jam penyuntikan, sehingga setelah 48 jam, MPL sudah tidak ditemukan pada organ limfoid, dalam hal ini splenosit.

Pemberian L-MPLP masing masing sebesar 2, 8 dan 16 mg/kgBB, semuanya menyebabkan penekanan yang bermakna secara statistik dibanding kontrol. Kadar interferon gamma masing-masing adalah 92,72 pg/ml, 64,16 pg/ml, dan 45,69 pg/ml, sedangkan kontrol adalah 116,24 pg/ml. Jadi, persentase kadar IFN γ bila dibandingkan kontrol, secara berturut turut adalah 79,7%, 55,2% dan 39%. Bila dibandingkan antara MPL dengan L-MPLP pada dosis yang sama, yakni 8 mg/kgBB, maka L-MPLP mampu menekan produksi IFN γ 1,8 kali lebih baik dibandingkan MPL; sedangkan untuk dosis sama yang lain, yakni 16 mg/kgBB, L-MPLP mampu menekan produksi IFN γ 2,5 kali lebih baik dibandingkan MPL. Hasil ini menunjukkan, bahwa dalam 48 jam setelah penyuntikan, MPL yang diharapkan sebagai bentuk aktif dari MPLP masih terdapat dalam organ limfoid, yang mampu menekan proliferasi limfosit. Untuk mengetahui berapa sebenarnya kadar MPLP atau MPL yang masih ada terutama dalam organ limfoid setelah 48 jam, diperlukan suatu studi farmakokinetik untuk L-MPLP.

Kemampuan L-MPLP dalam menekan proliferasi limfosit dapat dijelaskan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mishina, dkk¹⁰ yang menggunakan liposom metilprednisolon (L-MPL), bahwa distribusi L-MPL di limpa 24 kali lebih banyak dibanding metilprednisolon, waktu paruhnya meningkat dari 0,48 jam menjadi 30,13 jam dan ambilan MPL pada organ limfoid dan hepar meningkat menjadi 10 kali lebih banyak. Sedangkan, L-MPLP yang disuntikan secara intraperitoneal pada mencit dengan dosis 2 mg/kgBB pada penelitian Purwaningsih¹² menunjukkan, bahwa metabolit MPL atau MPLP terdistribusi lebih baik pada organ hepar, limpa dibandingkan MPL.

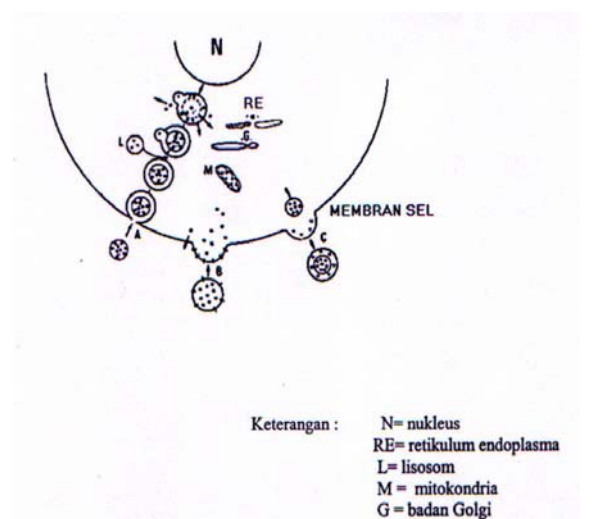
Penelitian yang dilakukan oleh Miller, dkk¹³ pada hewan coba tikus jantan *Sprague Dawley* yang diberi deksametason (Dex) menunjukkan, bahwa uji proliferasi

limfosit T yang diinduksi oleh mitogen concanavalin A pada kultur, terjadi hambatan proliferasi splenosit yang diinduksi mitogen concanavalin A. Hasil yang sama juga ditunjukkan oleh Benameur, dkk¹⁴ pada uji *in vitro*, bahwa baik liposom deksametason palmitat maupun deksametason, dapat menurunkan proliferasi limfosit sampai sebesar 94 %.

Hasil yang diperoleh pada uji *in vitro*, ke tiga konsentrasi MPL dan LMPLP yakni 10^{-3} mM, 10^{-2} mM dan 10^{-1} mM, menekan kadar interferon gamma yang berbeda bermakna secara statistik. Kadar IFN γ menurun sesuai peningkatan dosis kedua obat. Pada kadar LMPLP sebesar 10^{-3} mM, 10^{-2} mM dan 10^{-1} mM persentasi kadar IFN γ bila dibandingkan kontrol, secara berurutan adalah 58,40 %, 51,25 % dan 42,26 %, sedangkan MPL dengan kadar 10^{-3} mM, 10^{-2} mM dan 10^{-1} mM persentase kadar IFN γ bila dibandingkan kontrol, secara berurutan adalah 64,56 %, 34,26 % dan 22,25 %. Bila dibandingkan antara L-MPLP dan MPL pada konsentrasi yang sama yakni 10^{-3} mM, maka L-MPLP mampu menurunkan kadar IFN γ 1,1 kali lebih rendah, untuk konsentrasi 10^{-2} mM, kadar IFN γ 1,5 kali lebih rendah, sedangkan untuk konsentrasi 10^{-1} mM, L-MPLP mampu menurunkan 2 kali lebih rendah dibandingkan MPL.

Tingginya penekanan L-MPLP terhadap produksi INF γ menunjukkan, bahwa L-MPLP juga mempunyai aktivitas biologik, seperti halnya MPL sebagai obat standar. Ada tiga kemungkinan mekanisme interaksi antara sel dengan L-MPLP pada limfosit untuk menekan proliferasi yang dapat dijelaskan sebagai berikut (Gambar 3).

Pertama (A), setelah mengalami endositosis, liposom yang mengandung vakuola endositik akan berfusi



Gambar 3. Kemungkinan mekanisme interaksi sel dengan liposom⁵

dengan lisosom (L). Lisosom yang mengandung fosfolipase atau faktor lain, akan mengganggu dwilapis lipid liposom dan obat akan terlepas. Selanjutnya, obat yang terlepas akan bekerja langsung di dalam lisosom atau molekul obat akan berdifusi ke.

kompartmenten sel lainnya, misalnya ke dalam nukleus (N), retikulum endoplasma (ER), aparat golgi (G) atau ke mitokondria (M). Kemungkinan ke 2 (B) adalah, setelah mengalami fusi dengan membran sel, liposom akan membebaskan molekul obat ke dalam sitoplasma, terutama molekul obat yang berada di daerah hidrofili dari liposom, keluar menuju sitoplasma sel dan mencapai organel-organel lainnya. Kemungkinan ke 3 (C), setelah terjadi fusi dengan membran sel, molekul obat yang berada di daerah hidrofili dari liposom lamelar terluar, bersama-sama dengan molekul obat yang berada di bagian dalam dibebaskan di sitoplasma sel dan kemudian mencapai organel-organel lainnya. Dari ke tiga kemungkinan tersebut, L-MPLP yang merupakan bentuk monolamellar, mekanisme yang paling mungkin adalah mekanisme yang pertama (A). Liposom yang membawanya akan hancur oleh lisosom, selanjutnya hanya obat yang dibawanya saja (MPLP/MPL) yang masuk berikatan dengan reseptornya di sitoplasma, untuk selanjutnya masuk ke inti sel.

Hasil uji *in vitro* ini terlihat, bahwa kemampuan L-MPLP menekan produksi IFN γ pada konsentrasi yang sama dengan MPL, secara statistik terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan, kemungkinan obat aktif MPLP mempunyai aktivitas biologik lebih baik dibandingkan dengan MPL. Karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bagaimana MPLP bekerja dalam menghambat proliferasi splenosit.

Benamer, dkk¹⁴ juga melakukan penelitian yang menilai kemampuan liposom-deksametason palmitat terhadap respon mitogen secara *in vitro*. Hasil yang diperoleh ternyata, baik deksametason palmitat maupun liposom-deksametason palmitat menghambat terhadap produksi IFN γ sebesar 96 %. Kadar deksametason yang diperlukan untuk menghambat produksi tersebut adalah 10^{-6} M. Sedangkan, hasil maksimal yang diperoleh pada penelitian ini adalah pada kadar L-MPLP sebesar 10^{-1} mM, terjadi hambatan sebesar 77,7 %, jauh lebih kecil daripada deksametason. Hal ini menunjukkan, bahwa untuk menghambat produksi IFN γ , dosis deksametason yang diperlukan, sangat rendah. Sebagai perbandingan, dosis ekuivalen sebagai antiinflamasi pada manusia untuk metilprednisolon adalah 4 mg, sedangkan untuk deksametason adalah 0,75 mg dan potensi antiinflamasinya masing-masing adalah 5 untuk MPL dan 25 untuk Dex^{2,3}.

Ditinjau dari lipid yang digunakan untuk pembuatan liposom pada penelitian ini, EPC (*Egg yolk Phosphatidyl-choline*) adalah bahan yang lazim digunakan untuk pembuatan liposom konvensional yang telah teruji efeknya sebagai pembawa obat dari berbagai obat secara *in vitro* maupun *in vivo*^{7,8,9,10}. Liposom konvensional di dalam sirkulasi darah sering dirusak oleh lipoprotein HDL atau terikat dengan opsonin, sehingga mudah difagosit oleh makrofag akibatnya terjadi lisis sebelum mencapai sasaran. Penambahan TEL (tetraeter lipid) dapat menambah muatan negatif pada permukaan membran liposom, sehingga liposom tetap stabil¹⁵. Akan tetapi, TEL yang digunakan pada penelitian ini, yang mempunyai struktur monolayer, membentuk pasak dalam membran liposom EPC yang berfungsi sebagai penstabil membran.

Berdasarkan berbagai penelitian tentang uji toksisitas pada ke dua lipid tersebut membuktikan, bahwa baik pada EPC maupun TEL tidak toksik, tidak mutagenik atau anti mutagenik¹⁵, maka pemakaian liposom ini, yang mengandung EPC 5mM dan TEL 0,125 mM, diharapkan cukup aman untuk pemakaian jangka panjang.

4. Kesimpulan

Pemberian LMPLP dengan dosis yang lebih kecil dari MPL pada kultur *invivo* dan *invitro* mampu menekan produksi interferon gamma lebih baik dari MPL. Untuk melengkapi data efektivitas L-MPLP sebagai senyawa baru, masih diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui profil farmakokinetik sediaan L-MPLP seperti waktu paruh biologik, volume distribusinya di jaringan, bersihannya dalam darah, serta bagaimana proses metabolisme dan ekskresinya dalam tubuh. Diperlukan pula uji toksisitas subakut dan kronik untuk mengetahui keamanan sediaan ini pada penggunaan jangka panjang serta diperlukan pula uji farmakodinamik lain untuk menilai efektifitas seta toksisitas obat ini dibanding dengan standar, metilprednisolon.

Daftar Acuan

1. Cronstein BN, Clinical Use of Ethhylprednisolone Sodium Succinate: A Review. *Current Therapeutic Research* 1995; 56: 1-13.
2. Schimmer BP, Parker KL. Adrenocorticotrophic Hormone; Adrenocortical Steroids And Their Synthetic Analogs; Inhibitor Of Synthesis And Actions Of Adrenocortical Hormones. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman GA, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001: 1649-1677.
3. Chorousus GP, Margioris AN. Adrenocorticosteroids and Adrenocortical Antagonists. In: Katzung BG,

- editor. *Basic & Clinical Pharmacology*. 8th ed. New York: Lange Medical Books, 2001: 660-676.
4. Lasic DD, editor. *Liposomes from Physic to Application*, Amsterdam: Elsevier, 1993: 265 – 324.
 5. Gregoriadis G. The Carrier Potential Of Liposomes In Biology And Medicine (Second of two parts). *The New England Journal of Medicine* 1976; 295: 765 –770.
 6. Gregoriadis G. The Carrier Potential Of Liposomes In Biology And Medicine (First of two parts). *The New England Journal of Medicine* 1976; 295: 704 – 710
 7. Davidson RN, DiMartino L, Gradoni L, et al. Liposomal Amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean Visceral Leishmaniasis: A Multi-centre Trial. *Quart J Med* 1994; 87 :75-81.
 8. Huang SK, Mayhew E, Gilana S, Lasic DD, Martin FJ, et. al. Pharmacokinetics and Theurapeutics of Sterically Stabilized Liposomes in Mice Bearing C-26 Colon Carcinoma. *Cancer Research* 1992; 52: 6774-6781.
 9. Freise CE, Liu T, Hong K, et al. The Increased Efficacy And Decreased Nephrotoxicity Of Cyclosporine Liposome. *Transplantation* 1994; 576: 928 -932.
 10. Mishina EV, Staubinger RM, Pszyczy NA, Jusko WJ. Enhancement of Tissue Delivery and Receptor Occupancy of Methylprednisolone in Rats By Liposome Formulation. *J Pharmaceutical Research* 1993; 10: 1402–1409
 11. Morgan SJ, Darling DC, editors. In: *Animal Cell Culture*. Oxford: Bios Scientific Publishers 1993: 95-101.
 12. Purwaningsih EH. Inkorporasi Metilprednisolon Palmitat pada Membran Liposom yang Mengandung Tetraeter Lipid Berasal dari Archea serta Gambaran Distribusinya di Beberapa Organ Limfoid Pada Mencit. *Ringkasan disertasi*, Program Pascasarjana Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Indonesia, 2002.
 13. Miller AH, Spencer RL, Trestman RL, Kim C, Mc Ewen BS, Stein M. Adrenal Steroid Receptor Activation In Vivo and Immune Function. *Am J Physiol* 1991; 261: E126 – E131.
 14. Benameur H, De Ghand G, Brasseur R, Von Vooren, Legros FJ. Liposome Incorporated Dexamethasone palmitate. Chemical and Physical Properties. *Int J Pharmac* 1993; 88: 157-167.
 15. Freisleben HJ, Neisser C, Hartmann M, Rudolph P, Geck P, Ring K, Muller WEG. Influence of the Main Phospholipid (MPL) from Thermoplasma acidophilum and Liposomes from MPL on Living Cells: Cytotoxicity and Mutagenicity. *J Liposome Research* 1993; 3: 817-833.