

KARAKTERISASI FISIK LIPOSOM ASAM SALISILAT MENGUNAKAN MIKROSKOP ELEKTRON TRANSMISI

Elman Panjaitan

Pusat Teknologi Bahan Industri Nuklir (PTBIN)-BATAN
Kawasan Puspiptek, Serpong 15314, Tangerang

ABSTRAK

KARAKTERISASI FISIK LIPOSOM ASAM SALISILAT MENGGUNAKAN MIKROSKOP ELEKTRON TRANSMISI. Telah dilakukan karakterisasi fisik liposom yang diformulasikan dari asam salisilat dengan metode lapis tipis berbahan dasar lesitin kedelai dan kolesterol. Formula yang terbentuk diamati menggunakan mikroskop optik dan *Transmission Electron Microscope (TEM)*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa asam salisilat dapat diformulasikan dalam liposom. Kombinasi lesitin kedelai dan kolesterol (600 mg : 20 mg) merupakan formula terbaik, liposom berbentuk *vesicle* sferis dan berukuran 70 nm sampai dengan 800 nm.

Kata kunci : Liposom, Asam salisilat, TEM

ABSTRACT

THE PHYSICAL CHARACTERIZATION OF LIPOSOME SALICYLIC ACID USING TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE. The physical characterization of liposome, formulated from salicylic acid using thin film hydration methods with cholesterol and soybean lecithine, has been done. The formula was characterized by optical microscope and Transmission Electron Microscope (TEM). The observation result shows that the salicylic acid can be formulated to liposomes. Soybean lecithine combined with cholesterol (600 mg : 20 mg) was the best formula and the liposome was spherical vesicle like with dimension about 70 nm until 800 nm.

Key words : Liposome, Salicylic acid, TEM

PENDAHULUAN

Asam salisilat memiliki aktivitas keratorik dan antiseptik lemak jika digunakan secara topikal. Sifatnya yang asam meningkatkan hidrasi endogen, sehingga keratin terdistribusi di permukaan kulit yang pada gilirannya dapat meningkatkan kemampuan absorpsi ke dalam kulit. Selain itu, penggunaan jangka panjang pada daerah yang sama akan mengiritasi kulit sehingga menyebabkan dermatitis. Untuk mengurangi sifat iritatif pada kulit, dilakukan usaha mikroenkapsulasi dalam bentuk sistem liposom [1,2].

Liposom sebagai sistem pembawa, mengenkapsulasi bahan obat baik pada lapisan ganda lemak untuk obat yang bersifat non polar dan semi polar maupun di dalam kompartemen airnya untuk obat yang bersifat polar. Hampir semua karakter obat dapat dienkapsulasi dalam liposom dengan melakukan modifikasi pada cara pembuatannya [3-5].

Liposom tidak menimbulkan modifikasi kimia bahan obat dan dapat menjerat obat yang bersifat polar maupun yang bersifat non polar. Asam salisilat bersifat

hidrofil, tetapi sukar larut dalam air. Dilain pihak asam salisilat diharapkan terjerat dalam kompartemen air, karena asam salisilat harus dalam keadaan terlarut. Pelarut guna meningkatkan kelarutan asam salisilat digunakan pelarut campur yaitu, propilenglikol dan dafar fosfat pH 7,4. Pelarut campuran tersebut selain berfungsi sebagai pelarut, propilenglikol merupakan pelembab yang baik untuk kulit sedangkan dafar fosfat bertujuan pula untuk menekan pengaruh pH yang tinggi dari asam salisilat yaitu sekitar pH 2 hingga pH 3 dalam larutan jenuhnya. Hal ini disebabkan lemak penyusun liposom akan terhidrolisis pada pH asam [1,6].

Liposom dapat diformulasikan dengan komposisi dan cara yang berbeda. Cara pembuatan liposom yang beragam memungkinkan bentuk, ukuran dan lamelalitas *vesicle* liposom yang berbeda. Keragaman bentuk, ukuran dan lamelalitas tersebut dapat disesuaikan dengan karakter obat dan tujuan pemakaiannya [7,8] dan dalam penelitian ini lebih menekankan pada homogenitas bentuk liposom *multilamellar vesicles (MLV)* yang

diformulasi menggunakan metode lapisan tipis dengan bahan dasar lesitin.

Berdasarkan sifat fisikokimia asam salisilat dan kemampuan penjeratan liposom, maka metode yang dipilih dalam pembuatan liposom adalah metode lapis tipis. Dengan menggunakan metode lapisan tipis tersebut akan dihasilkan tipe *MLV*. Liposom tipe *MLV* yang terbentuk diharapkan melepaskan bahan obat secara berkesinambungan setelah liposom berpenetrasi ke dalam kulit. Dalam percobaan ini lemak penyusun dinding *vesicles* liposom yang digunakan adalah lesitin kedelai dan kolesterol, pemilihan ini disebabkan kedua komponen lemak tersebut mampu meningkatkan rigiditas dinding *vesicles* liposom yang pada gilirannya menentukan kestabilan fisik sistem liposom [3,4].

Karakteristik fisik liposom merupakan parameter *quality control* liposom, karenanya perlu dilakukan penelitian karakterisasi fisik liposom asam salisilat yang bertujuan untuk mempelajari bentuk dan ukuran liposom berbasis lesitin dan kedelai menggunakan mikroskop elektron transmisi.

METODE PERCOBAAN

Percobaan ini dibuat menggunakan bahan-bahan seperti berikut ini : asam salisilat, lesitin, kolesterol, propilenglikol, kloroform, natrium dihidrogen fosfat, natrium hidroksida, metanol, *collodion* 2% dalam amil alkohol, uranil asetat dan air suling. Sedangkan formulasi liposom yang dilakukan meliputi 9 formula, seperti ditunjukkan pada Tabel 1, dengan metode dan proses seperti yang dilakukan pada referensi [9].

Tabel 1. Formula liposom asam salisilat

Bahan	Formula									Blangko
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Asam salisilat (mg)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	-
Lesitin (mg)	200	200	200	400	400	400	600	600	600	600
Kolesterol (mg)	10	20	30	10	20	30	10	20	30	30
Propilen glikol (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Dapar fosfat pH 7,4 (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Preparasi samlel guna pengamatan bentuk dan ukuran *vesicle* liposom dengan menggunakan *Transmission Electron Microscope (TEM)* adalah seperti langkah-langkah berikut : (i). Sampel 1 : 100 - 1 : 1000 diencerkan pada dapar PO_4 pH 7,4. (ii) *Collodion* 2 % (nitroselulosa dalam amil alkohol) dikembangkan pada permukaan air beker gelas. (iii) Tutup dan biarkan beberapa menit sampai terbentuk selaput tipis halus pada permukaan air. (iv) *Collodion* dapat diganti dengan Formfar (*para-formaldehid*) yang dapat menghasilkan lapisan penyangga yang lebih tebal dan kuat. (v) *Grid* yang telah dibersihkan diletakan pada permukaan selaput *collodion* yang rata, setelah didiamkan $\pm 30''$ angkat dengan bantuan parafilm,

selanjutnya dikeringkan pada suhu ruangan selama 1 hari, yang selanjutnya dihisap menggunakan kertas Wattman No.1. (vi). Zat warna, uranil asetat 1-2% atau asam fosfatungsit, ditetaskan dan dibiarkan selama ± 1 menit, keringkan dengan kertas Wattman No.1, siap untuk diamati.

Sebelum dilakukan pengamatan bentuk dan ukuran liposom menggunakan instrumen *Transmission Electron Microscope (TEM)* Philips CM-12, dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop optik Nikon UFX-35 DX, di laboratorium Bidang Bahan Industri Nuklir, Pusat Teknologi Bahan Industri Nuklir-BATAN.

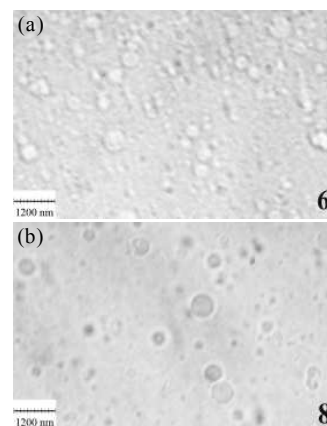
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan bentuk liposom berbasis asam salisilat, hasil pengamatan menggunakan mikroskop optik mempunyai rentang ukuran antara 0,1 μm hingga 0,7 μm dengan wujud liposom berbentuk sferis yang beragam seperti ditunjukkan pada Tabel 2.

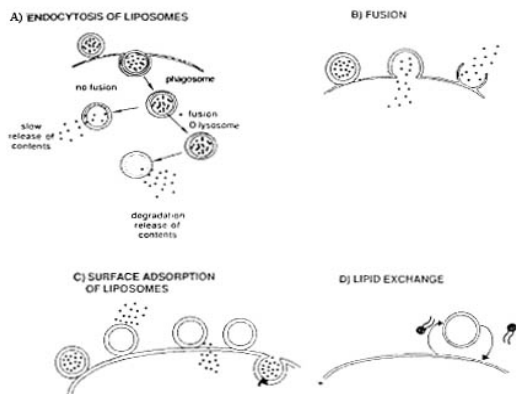
Tabel 2. Ukuran partikel dan wujud dari liposom asam salisilat

Formula	Ukuran partikel (μm)	Wujud
1	$\pm 0,080-1,000$	<i>Vesicle</i> heterogen dan banyak yang bocor
2	$\pm 0,100-0,990$	<i>Vesicle</i> sferis
3	$\pm 0,400-1,000$	Bentuknya tidak beraturan, banyak yang bocor dan beragregasi
4	$\pm 0,020-1,200$	<i>Vesicle</i> sferis dan sangat heterogen
5	$\pm 0,150-1,500$	<i>Vesicle</i> sferis, ada beberapa yang bocor
6	$\pm 0,200-0,700$	<i>Vesicle</i> sferis dan cenderung homogen
7	$\pm 0,500-1,300$	<i>Vesicle</i> sferis besar- besar
8	$\pm 0,100-0,500$	<i>Vesicle</i> sferis dan cenderung homogen
9	$\pm 0,050-0,200$	Beragregasi dan banyak yang bocor

Penampakan bentuk sferis dengan dimensi ukuran yang beragam serta tertampaknya sferis liposom yang pecah disebabkan pengaruh panas pada saat pembuatan lapisan tipis. Pemanasan tersebut sangat berperan dalam pembentukan sistem lamelar lapisan ganda lemak pada dinding labu dan membantu mempercepat penguapan



Gambar 1. Gambar optik sampel liposom *MLV* (a) Formulasi 6 dan (b) Formulasi 8, menggunakan mikroskop optik dengan perbesaran 400 kali yang di zoom in 3 kali



Gambar 2. Proses pelepasan obat dalam liposom [8]

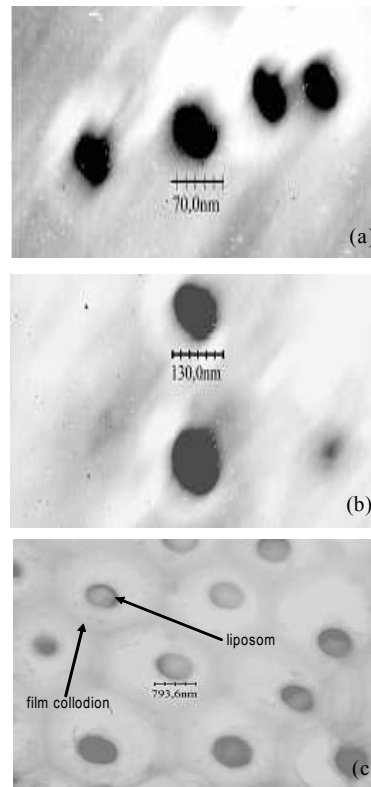
kloroform. Akan tetapi berbeda saat menghidrasi, panas di atas temperatur transisi lesitin sangat diperlukan untuk mempercepat agregasi lapisan ganda lemak yang tersusun planar menjadi vesicle liposom.

Memperhatikan hasil pengamatan mikroskop optik, seperti terlihat pada Gambar 1, formula keenam dan kedelapan menghasilkan liposom dengan distribusi wujud dan ukuran yang relatif homogen dibandingkan formula yang lain. Dimensi liposom yang mempunyai distribusi ukuran relatif merata, formula enam dan delapan tersebut, mempunyai ukuran masing-masing yaitu: 0,200 µm hingga 0,700 µm dan 0,100 µm hingga 0,500 µm.

Bentuk liposom yang cenderung pecah, tidak dapat berfungsi sebagai kantung pembawa obat, hal ini didasarkan pada mekanisme liposom sebagai pembawa obat diharapkan tidak terlarut dan atau pecah sampai pada kondisi keasaman tertentu, sehingga obat yang dibawa liposom dapat berfungsi efektif dan terlarut pada daerah tertentu yang diharapkan. Mekanisme tersebut dapat diterangkan seperti ditunjukkan pada Gambar 2, yang menunjukkan mekanisme pelepasan obat yang dibawa liposom yang terdiri dari 4 proses yaitu : proses endositosis, proses fusi, proses absorpsi permukaan dan proses pertukaran lemak.

Liposom yang dimungkinkan untuk mendapatkan bentuk sferis yang utuh, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1 tersebut, memiliki formulasi masing – masing : formulasi (6) memiliki kandungan asam salisilat (mg) : lesitin (mg) : kolesterol (mg) : propilen glikol (mL) : dafar posfat pH7,4 (mL) adalah 50 : 400 : 30 : 5 : 10, sedangkan untuk formulasi (8) memiliki kandungan asam salisilat (mg) : lesitin (mg) : kolesterol (mg) : propilen glikol (mL) : dafar posfat pH7,4 (ml) adalah 50 : 600 : 20 : 5 : 10.

Pengamatan menggunakan TEM seperti tertampak pada Gambar 3 ditekankan pada liposom yang dihasilkan berdasarkan formula (8). Hal ini didasarkan pada hasil pengamatan mikroskop optik pada Gambar 1, yang menunjukkan bahwa liposom dengan formula 8 mempunyai bentuk liposom MLV yang sferis dengan jumlah cacat dan jumlah liposom bocor relatif sedikit dibandingkan hasil formula lainnya. Pengamatan menggunakan mikroskop elektron transmisi (TEM)

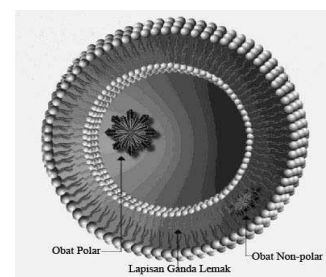


Gambar 3. Foto formula 8 menggunakan TEM, menunjukkan liposom dengan konsentrasi pewarnaan berbeda yaitu (a) 2 % uranil, (b) 1½ % uranil dan (c) 1 % uranil.

menunjukkan liposom asam salisilat berbentuk sferis, dengan ukuran antara 70 nm sampai dengan 800 nm.

Gambar 3(a) menunjukkan bentuk liposom yang relatif berukuran lebih kecil (diameter 70 nm) dibandingkan Gambar 3(b) (diameter 130 nm) dan 3(c) (diameter 793 nm) dengan warna yang lebih gelap. Warna gelap disebabkan pewarnaan sampel (penetasan uranil) relatif lebih pekat dibandingkan dengan lainnya, demikian halnya warna liposom pada Gambar 3(b) lebih pekat dibandingkan warna liposom pada Gambar 3(c).

Hasil pengamatan TEM, tidak menunjukkan bentuk yang jelas liposom yang terdiri dari dua lapisan yaitu lapisan luar dan lapisan dalam yang dibangun oleh lapisan ganda lemak seperti yang ditunjukkan secara skematis pada Gambar 4. Kompartemen bagian luar sebagai tempat obat non polar dan kompartemen bagian dalam sebagai tempat obat polar, tidak terlihat pada



Gambar 4. Skema liposom sebagai sistem pembawa obat [10].

gambar strukturmikro liposom hasil pengamatan Gambar 3. Struktur ini diharapkan dapat teramati pada liposom yang terbelah.

Ketidakterlihatannya lapisan tersebut diantaranya disebabkan pewarnaan, konsentrasi kepekatan uranil pada proses pewarnaan sampel sukar dikendalikan. Hal ini disebabkan penetesan uranil dilakukan pada *grid*, yang berfungsi sebagai penyangga sampel liposom relatif kecil sekali. Sedangkan diameter penyangga sampel 3 mm, sehingga sebaran larutan uranil sukar dikendalikan.

KESIMPULAN

Hasil karakterisasi fisik liposom berbasis asam salisilat menggunakan metode mikroskop elektron transmisi menunjukkan bahwa liposom yang dibangun menggunakan metode lapisan tipis menampakkan bentuk sferis terbaik pada formulasi 8 (asam salisilat (mg) : lesitin (mg) : kolesterol (mg) : propilen glikol (mL) : dafar posfat pH 7,4 (mL)) adalah (50 : 600 : 20 : 5 : 10) dengan ukuran diameter liposom antara 70 nm sampai dengan 800 nm.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Desy Diah R., S.Si., Apt. atas penyediaan dan preparasi duplikan sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

DAFTAR ACUAN

- [1]. G.K. MC EVOY, *American Hospital Formulary Service, Drug Information*, American Society of Hospital Pharmacist Inc., New York, **1** (2001) 1359
- [2]. M.A. ABUSANIT, M.S. MIAN, *Salicylic acid. In: Analytical Profiles of Drug Substances and Experiences*. New York: Academic Press, **23** (1994) 421
- [3]. S.S. BHALERAO, A.R. HARSHAL, *Preparation, Optimization, Characterization and Stability Studies of Salicylic Acid Liposomes*, DDIP, **4** (29) (2003) 451
- [4]. J.C. BOYLAND, *Liposomes as Pharmaceutical Dosage Form to Microencapsulation. In: Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1994) 1
- [5]. D.D. LASIC, *Liposomes: From Physics to Applications*, Elsevier, New York, (1993) 3
- [6]. <http://www.drugdeliverytech.com/cgi-bin/articles.cgi?idArticle=53>, Diakses 30 Oktober, (2004)
- [7]. U.K. NASSANDER, P.A.M. PETERS, *Crommelin DJA. Liposome. In: Biodegradable Polymers As Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1990) 261
- [8]. <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2002/liposome.jpg>, (2004)
- [9]. DEASY DIAH D. dan ELMAN PANJAITAN, *Jurnal Ilmu dan Rekayasa Teknologi Industri*, **11** (1) IV (2005) 2041-2049
- [10]. http://www2.chemie.unierlangen.de/services/dissonline/data/dissertation/Christoph_Wabel/html, (2004)