

Uji Aktivitas Antiproliferasi Formula Liposom Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma domestica*) Terhadap Sel Kanker Payudara T47D

Gabriella Pasaribu¹, Iskandarsyah¹, Erny Sagita¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia

Email: erny.sagita@farmasi.ui.ac.id

Abstrak

Kanker payudara merupakan salah satu penyakit mematikan di dunia. Ekstrak kunyit diketahui memiliki aktivitas antiproliferasi. Ekstrak kunyit dienkapsulasi dengan liposom, yaitu sebuah vesikel lipid bilayer yang berfungsi sebagai pembawa obat kanker dalam tubuh, untuk meminimalisasi toksisitasnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh enkapsulasi ekstrak etanol kunyit terhadap aktivitas antiproliferasi sel kanker payudara T47D secara *in vitro*. Liposom dibuat dengan metode lapis tipis dan dikecilkan ukuran partikelnya dengan ekstrusi. Bahan yang digunakan adalah fosfatidilkolin, kolesterol, dan ekstrak kunyit. Optimasi liposom dibuat dalam tiga formulasi dengan perbedaan konsentrasi ekstrak. Formulasi paling optimal adalah formulasi dengan jumlah ekstrak paling sedikit, dilihat dari parameter fisik, yaitu endapan paling halus dan waktu pengendapan paling lama. Liposom dievaluasi ukuran partikel dan potensial zetanya dengan DLS, morfologinya dengan TEM, dan efisiensi penjerapannya dengan dialisis. Formulasi paling optimal diuji aktivitas antiproliferasinya dan dibandingkan dengan ekstrak yang tidak dienkapsulasi liposom dengan metode 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT). Hasilnya terdapat pengaruh penurunan aktivitas antiproliferasi ekstrak yang terenkapsulasi liposom. IC_{50} liposom ekstrak adalah 45,762 $\mu\text{g/ml}$ dan IC_{50} ekstrak adalah 36,399 $\mu\text{g/ml}$. Ukuran partikel liposom adalah di bawah 445 nm. Potensial zeta liposom adalah -7,51 mV. Morfologi liposom adalah LUV dan MVV. Efisiensi penjerapan liposom adalah 63,80%. Berdasarkan hasil tersebut, dapat dikatakan bahwa enkapsulasi ekstrak kunyit dalam liposom dapat mengurangi toksisitasnya terhadap sel kanker.

Abstract

Breast cancer is one of deadliest diseases in world. Turmeric extract was known to have antiproliferative activity. To minimize its toxicity, turmeric extract was encapsulated with liposome, a vesicle lipid bilayer functioned as cancer drug carrier in body. This research aimed to determine encapsulation effect of turmeric ethanol extract against antiproliferative activity in T47D breast cancer cells through *in vitro* assay. Liposomes was made using thin layer method and particle size was reduced by extrusion. Materials used are phosphatidylcholine, cholesterol, and turmeric extract. Optimization of liposomes was made in three formulations with different concentrations of extract. Most optimal formulation was formulation with minimum amount of extract, judging from physical parameters which have smallest precipitates and longest settling time. Evaluation liposome particle size and zeta potential was used DLS, morphology was used TEM, and entrapment efficiency was used dialysis. Most optimal formulation was tested their antiproliferative activity compared with not encapsulated extracts used 3-(4,5-dimethylazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. There was decrease antiproliferative activity of encapsulated extracts. IC_{50} encapsulated extracts was 45.762 $\mu\text{g/ml}$ and IC_{50} extracts was 36.399 $\mu\text{g/ml}$. Liposome particle size was below 445 nm. Zeta potential was -7.51 mV. Morphology was LUV and MVV. Entrapment efficiency was 63.80%. It could be concluded that encapsulation of turmeric extract into liposome could reduce its toxicity against cancer cells.

Keywords: antiproliferative activity, breast cancer, liposom, MTT, turmeric extracts

PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyakit yang menjadi penyebab utama kematian di seluruh dunia dan menyumbang 8,2 juta kematian (22% dari semua kematian dari penyakit tidak menular) pada tahun 2012. Di Indonesia, angka kematian akibat penyakit kanker mencapai 111 per 100.000 populasi (WHO, 2014). Jenis kanker yang saat ini banyak diderita oleh pasien kanker di dunia antara lain kanker payudara, serviks, paru-paru, usus, perut, hati, ovarium, esofagus, pankreas, darah, dan kulit (Global Cancer Facts & Figures, 2011). Kanker payudara merupakan jenis kanker yang saat ini menduduki persentase cukup tinggi pada wanita. Pada tahun 2011 sejumlah 508.000 wanita meninggal akibat kanker payudara (WHO, 2014).

Kanker dapat diterapi dengan operasi, radiasi, kemoterapi, hormon, dan imunoterapi (Global Cancer Facts & Figures, 2011). Kemoterapi adalah tipe terapi penyakit kanker yang ditujukan untuk membunuh atau memperlambat pertumbuhan sel kanker, yang tumbuh dan membelah secara cepat. Namun, kemoterapi ini dapat juga merusak sel normal tubuh yang membelah cepat, seperti sel pada mulut, usus, maupun rambut. Kerusakan pada sel normal ini dapat menyebabkan efek samping yang tidak diinginkan pada pasien penderita kanker (Chemotherapy and You, 2011). Untuk meminimalisasi efek samping obat dalam tubuh tersebut, penggunaan ekstrak alami sebagai senyawa antikanker sudah cukup banyak diteliti, seperti ekstrak

brokoli (Anupama, Murgan, Murthy, & Blakrishna, 2008), ekstrak manggis (Limei, Zhao, Yang, & Bai, 2009), ekstrak kunyit (Mohammad, Nosratollah, & Rahmat, 2010) dan banyak ekstrak tanaman lainnya. Kunyit (*Curcuma domestica*, Val.) merupakan tanaman yang berpotensi tinggi untuk digunakan dalam pengobatan. Pemakaiannya cenderung meningkat, baik di Indonesia maupun di berbagai negara di dunia. Di Indonesia sendiri, kunyit merupakan salah satu mata dagang komoditi ekspor (Rukmana, 1994). Kurkumin adalah senyawa polifenol alami yang diisolasi dari bagian rhizoma tanaman kunyit, di mana kurkumin memiliki sejumlah manfaat yang telah diketahui, seperti antioksidan, antiinflamasi, dan agen hipokolesterolemik. Kurkumin ternyata juga mampu mempengaruhi apoptosis dari sel kanker manusia di dalam berbagai organ, seperti sel B dan sel T pada usus besar, epidermis, kelenjar prostat, payudara, dan otak (Aggarwal, Kumar, & Bharti, 2003). Liposom merupakan salah satu pembawa yang baik digunakan untuk mengurangi efek toksik, meningkatkan kelarutan dan penetrasi senyawa yang dibawanya. Liposom sebagai pembawa dari kurkumin juga telah diformulasi dan diuji secara fisik, di mana liposom dibuat dengan metode hidrasi lapis tipis, dengan komposisi formula soluthin MD : kolesterol : kurkumin 700:30:10 dan 525:30:10 (Yunianto, 2007). Sementara itu, formulasi liposom dari ekstrak kunyit dan uji aktivitasnya pada sel-sel kanker belum banyak dikembangkan. Dalam penelitian ini akan dilakukan optimasi formulasi

liposom ekstrak etanol kunyit dengan tiga perbandingan jumlah ekstrak kunyit. Efisiensi penyerapan yang paling baik dari tiga formulasi ini dipilih dan dibandingkan aktivitas antiproliferasinya dengan ekstrak kunyit yang tidak diformulasikan dalam bentuk liposom pada sel kanker payudara T47D.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuat formulasi sediaan liposom yang mengandung ekstrak etanol kunyit dengan karakter yang paling baik dan mengetahui perbandingan aktivitas antiproliferasi antara ekstrak etanol kunyit yang dienkapsulasi liposom tersebut dengan ekstrak kunyit yang tidak dienkapsulasi. Penelitian ini penting dilakukan untuk mencari alternatif obat antikanker yang lebih aman atau menimbulkan efek samping yang lebih sedikit dibandingkan dengan senyawa kimia sintetis.

METODE

Bahan yang di gunakan yaitu ekstrak etanol kurkumin (Balitro, Indonesia), Phospholipon

90G (Lipoid, Jerman), kolesterol (Sigma Aldrich, Jerman), diklorometan (Merck, Jerman), kalium dihidrogen fosfat (Merck, Jerman), sel kanker payudara T47D (LAPTIAB BPPT, Indonesia).

Alat yang di gunakan yaitu Freeze dryer (Scanvac), *rotary evaporator* (Hahn Shin Scientific Co.), mini extruder set (Avanti Polar Lipids), syringe Gas Tight (Hamilton), membran polikarbonat 0,4 μm dan 0,1 μm (Whatman), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV-1800), Transmission Electron Microscopy (Tecnai G2), Dynamic Light Scattering (Malvern).

Pembuatan liposom dengan metode hidrasi lapis tipis

Liposom diformulasikan dengan campuran dari fosfatidilkolin, kolesterol dan ekstrak etanol kunyit dengan perbandingan berat ekstrak 1:2:3. Liposom dibuat dengan metode lapis tipis. Formula liposom yang dibuat dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Formula liposom ekstrak etanol kunyit

Nama Bahan	Formula I	Formula II	Formula III
Fosfatidilkolin (mg)	500	500	500
Kolesterol (mg)	50	50	50
Ekstrak etanol kunyit (mg)	30	60	90

Semua bahan ditimbang sesuai formulasi kemudian dilarutkan dalam total 20 ml diklorometan kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat. Larutan kemudian diuapkan

sampai kering dengan kondisi vakum dalam *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan kecepatan putaran 100 rpm. Lapisan lipid yang terbentuk berupa film kering kemudian

dialiri gas N₂ dan kemudian disimpan dalam *freezer* selama satu malam sampai mencapai kesetimbangan dengan lingkungan dan supaya pelarut dapat hilang sempurna. Setelah dibiarkan semalaman, lapisan tipis dihidrasi dengan 50 ml larutan dapar fosfat pH 7,4 dengan kecepatan *rotary evaporator* 100 rpm dan suhu 45°C tanpa dikondisikan dalam keadaan vakum. Suspensi yang terbentuk dimasukkan ke dalam vial dan dialiri dengan gas N₂. Kemudian, suspensi disimpan di dalam lemari pendingin. Liposom yang telah terbentuk diseragamkan ukurannya dengan memakai alat *mini extruder set* menggunakan membran polikarbonat berukuran 0,4 µm dan 0,1 µm. Hasil ekstrusi dimasukkan ke dalam vial lain, dialiri dengan gas N₂ dan kemudian disimpan di dalam lemari es.

Evaluasi liposom

Morfologi bentuk liposom. Morfologi karakteristik dan ukuran liposom dievaluasi dengan TEM (*Transmission Electron Microscopy*). Sampel liposom diencerkan dengan pengenceran 20x dan 50x, lalu ditetaskan sampel pada *formvar coated cumprum grid* sebanyak satu tetes dan dikeringkan pada suhu ruang, setelah kering dianalisa dengan TEM.

Distribusi ukuran partikel liposom.

Distribusi ukuran partikel liposom dievaluasi menggunakan metode *light scattering* (pemendaran cahaya) dengan *Dynamic Light Scattering* (DLS). Sampel liposom diencerkan dengan pengenceran 1 tetes dalam 10 ml larutan pendispersi, yaitu dapar fosfat

7,4. Sampel dimasukkan ke dalam kuvet dan dianalisis pada suhu 25°C.

Potensial zeta. Potensial zeta liposom dievaluasi dengan menggunakan *zeta-sizer*. Sampel liposom diencerkan dengan pengenceran 1 tetes dalam 10 ml larutan pendispersi, yaitu dapar fosfat 7,4. Sampel dimasukkan ke dalam kuvet dan dianalisis pada suhu 25°C.

Efisiensi penjerapan liposom. Efisiensi penjerapan liposom dievaluasi dengan metode dialisis dengan menggunakan membran selofan. Pada alat dialisis, bagian donor dimasukkan sampel liposom sebanyak 0,5 ml dan bagian akseptor dimasukkan dapar fosfat pH 7,4 sebanyak 0,5 ml. Alat dialisis diputar selama 38 jam, pada jam ke 8, 16, 24 dan 38, larutan akseptor tersebut diambil dan diganti dengan dapar fosfat pH 7,4 yang baru. Setelah 38 jam, larutan donor dikumpulkan dan dilarutkan dengan metanol dengan faktor pengenceran tertentu. Larutan donor merupakan liposom yang sudah dimurnikan dari ekstrak bebas dan vesikel liposom tersebut dihancurkan dengan metanol agar dapat menganalisa jumlah ekstrak yang terenkapsulasi dengan liposom. Larutan tersebut diukur serapannya pada spektrofotometer UV-Vis dan dimasukkan ke dalam rumus perhitungan. Dari rumus tersebut dapat diketahui efisiensi penjerapan liposom.

Persentase berat ekstrak yang dienkapsulasi dengan liposom dihitung dengan rumus:

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

Di mana, W adalah jumlah obat yang terdapat dalam larutan donor, y adalah serapan sampel yang terukur pada spektrofotometer UV-Vis, m adalah volume total medium, a dan b didapatkan dari persamaan regresi kurva kalibrasi ekstrak kunyit dalam metanol, dan 1000 adalah faktor konversi dari μg ke mg. Efisiensi penjerapan dihitung dengan membandingkan konsentrasi ekstrak yang dienkapsulasi dengan liposom dengan konsentrasi total suspensi liposom yang telah ditetapkan kadarnya terlebih dahulu.

$$\text{Efisiensi Penjerapan (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi ekstrak yang terjerap}}{\text{Konsentrasi total suspensi liposom}} \times 100 \%$$

Sel kanker payudara T47D diperoleh dari LAPTIB, BPPT, Serpong. Sel yang telah mencapai konfluensi 80% dilakukan pemanenan secara tripsinasi. Setelah dipanen, jumlah sel dihitung menggunakan pewarnaan *trypan blue* dan peralatan *haemocytometer* untuk menentukan jumlah sel/mL. Sejumlah sel yang diperlukan kemudian ditransfer ke dalam tabung konikal dan ditambahkan medium kultur sesuai dengan konsentrasi sel yang dikehendaki yaitu 5×10^4 sel/sumuran. Setelah selesai dihitung, dilakukan *plating* sel menggunakan 96 sumuran. Sel selanjutnya digunakan untuk perlakuan menggunakan sampel uji. Suspensi sel dimasukkan ke dalam sumuran, masing-masing 100 μL , setiap kali mengisi 12 sumuran, sel diresuspensi kembali agar tetap homogen. Disisakan 3 sumuran kosong (jangan diisi sel) untuk diisi

Uji aktivitas antiproliferasi liposom dan larutan ekstrak etanol kunyit

Dari hasil evaluasi ketiga formulasi liposom yang dilakukan, formulasi liposom ekstrak etanol kunyit yang paling optimal diuji secara *in vitro* pada sel kanker payudara T47D, dan dibandingkan aktivitas antiproliferasinya dengan larutan ekstrak etanol kunyit yang tidak diberikan perlakuan enkapsulasi dengan liposom. Parameter yang dilihat adalah nilai IC_{50} dengan doksorubisin sebagai kontrol positif.

medium kultur sebagai blanko. Sel diinkubasi pada inkubator CO_2 5%, suhu 37°C hingga sel menempel pada dasar sumuran (± 24 jam). Selanjutnya sel diamati di bawah mikroskop, apabila sel sudah menempel pada dasar plat dan mencapai konfluensi $\pm 70\%$, sel sudah siap untuk diberikan perlakuan selanjutnya. Untuk pengujian ini, digunakan 1×10^4 sel per sumur (*well*) dalam total 96 sumur. Uji dilakukan dengan 6 konsentrasi dari 3 sampel pengujian yaitu larutan ekstrak etanol kunyit, ekstrak etanol kunyit yang dienkapsulasi dengan liposom, dan kontrol positif doksorubisin. Semua larutan uji termasuk liposom ekstrak etanol kunyit dibuat steril dengan metode aseptis.

Sel kanker payudara T47D dikembangkan selama 24 jam. Kemudian ditambahkan 6

konsentrasi dari sampel yaitu 0,1; 1; 5; 10; 50; dan 100 $\mu\text{g/mL}$, dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah itu ditambahkan 50 μL medium kultur (1 mg/mL yang dilarutkan dengan PBS) ke dalam masing-masing sumur dan kemudian diinkubasi 4 jam sebelum diganti medium. Kemudian ditambahkan 100% DMSO 100 μL ke dalam setiap sumur dan digoyang selama 10 menit pada suhu ruang. Lalu diukur *optical density* (OD) pada panjang gelombang 595 nm dengan ELISA. Setelah itu dihitung IC_{50} dari masing-masing sampel, dan dibandingkan efektivitasnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode lapis tipis dipilih pada penelitian ini karena merupakan metode pembuatan liposom yang paling umum digunakan. Bahan yang digunakan adalah fosfatidilkolin, kolesterol, dan ekstrak etanol rimpang kunyit. Fosfatidilkolin dan kolesterol digunakan sebagai bahan dasar pembentuk lipid bilayer pada liposom, sedangkan ekstrak etanol rimpang kunyit digunakan sebagai zat aktif. Pada penelitian ini dibuat tiga formulasi, dengan perbedaan pada konsentrasi ekstrak etanol rimpang kunyit yang digunakan. Perbandingan konsentrasi ekstrak etanol rimpang kunyit yang dibuat adalah 1:2:3. Adanya tiga formuladengan tiga perbandingan ekstrak dilakukan untuk melihat penampilan fisik yang paling baik di antara ketiganya. Semua jumlah ekstrak pada ketiga formula di atas dipilih di atas nilai IC_{50} ekstrak kunyit dari penelitian sebelumnya. Pada penelitian sebelumnya ktivitas antiproliferasi dari

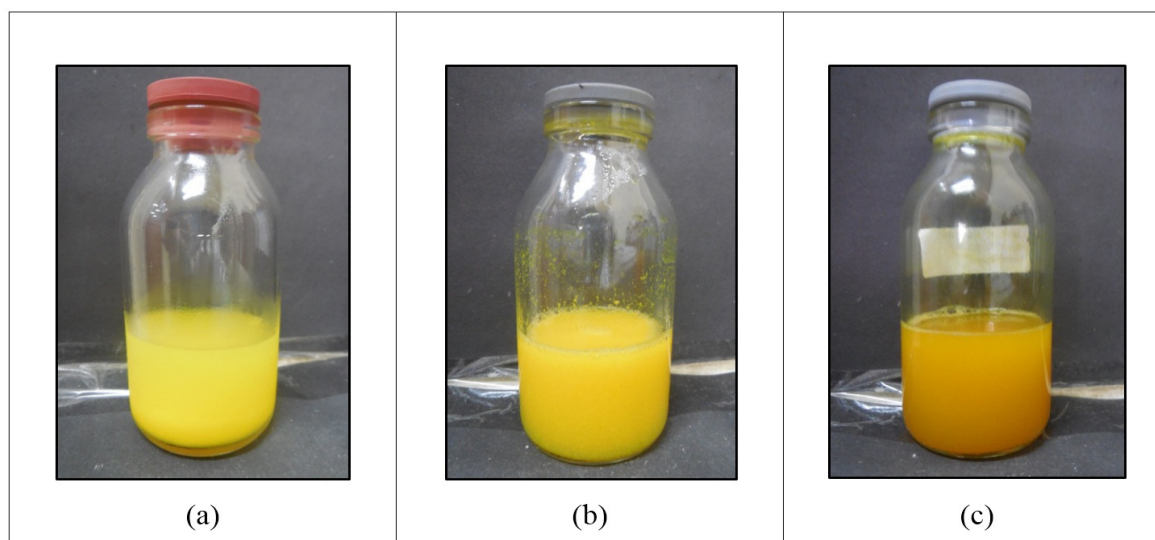
ekstrak n-heksana kunyit memiliki nilai IC_{50} sebesar 260 $\mu\text{g/ml}$, yang setara dengan 13 mg ekstrak n-heksana kunyit (Mohammad, Nosratollah, & Rahmat, 2010). Hal ini dilakukan guna membuat formula liposom yang memiliki konsentrasi lebih tinggi dari penelitian sebelumnya sehingga dapat dibuat rentang pengenceran yang dibutuhkan dalam uji antiproliferasi.

Ketiga formula suspensi liposom dikecilkan dan diseragamkan ukurannya dengan cara ekstrusi menggunakan alat *mini extruder set* menggunakan membran polikarbonat berukuran 0,4 μm dan 0,1 μm . Secara umum Hasil yang didapat dari ketiga formulasi yaitu adanya kecepatan pengendapan yang lebih lama dan endapan yang lebih halus. Berdasarkan pengamatan hasil ekstrusi dari ketiga formulayang dilakukan, formula yang menghasilkan endapan paling halus dan paling lama mengendap adalah Formula 1. Berdasarkan hasil pengamatan secara visual terhadap penampilan fisik dari liposom, faktor endapan yang terbentuk pada suspensi menjadi faktor utama pemilihan formula liposom yang terbaik. Faktor endapan ini menjadi faktor utama yang diperhatikan karena adanya endapan pada suspensi menandakan bahwa banyak vesikel yang beragregasi. Vesikel yang beragregasi menandakan bahwa suspensi liposom kurang stabil. Pengendapan yang terjadi dalam waktu yang lama akan menyebabkan pemisahan fase yang tetap atau tidak akan lagi terdispersi menjadi suspensi homogen (Malvern, n.d). Selain karena faktor kestabilan, formula yang

akan dipilih adalah formulasi yang memiliki paling sedikit ekstrak yang tidak terjerap. Hal tersebut dapat dilihat dari parameter fisik yang telah dijelaskan di atas, dimana ekstrak yang tidak terjerap akan mengendap pada buffer pH 7,4. Formula 1 adalah formulasi yang memiliki ekstrak tidak terjerap paling sedikit dilihat dari endapan ekstraknya yang paling sedikit dan halus di antara ketiga formula.

Dari hasil pengamatan dan analisis ini, didapatkan kesimpulan bahwa formula liposom yang paling baik adalah formulai

1 (Gambar 1) dikarenakan endapan yang dihasilkan lebih halus dengan kecepatan pengendapan yang paling lama dibandingkan kedua formulasi lain. Namun, dikarenakan waktu pengendapan formulasi ini juga masih memiliki waktu pengendapan yang cukup lama, maka dicoba pembuatan formulasi 1 dengan penambahan tween 80. Alasan penambahan tween 80 adalah tween 80 dapat berfungsi sebagai *wetting agent* pada konsentrasi 0,1-3% (Rowe, Sheskey, & Qui, 2005).



Gambar 1. Hasil suspensi liposom ekstrak kunyit setelah dihidrasi (a) Formulasi 1, (b) Formulasi 2, dan (c) Formulasi 3

Hasil yang terbentuk adalah suspensi liposom yang tidak mengendap setelah disimpan semalaman di dalam kulkas dan bahkan sampai seminggu setelah penyimpanan. Dengan penambahan tween 80 ini, ekstrak yang masih tidak terjerap pada formulasi 1 dan mengendap pada buffer pH 7,4 juga dapat terlarut pada medium. Oleh karena suspensi yang terbentuk lebih baik dalam hal kestabilan dispersi partikelnya, formulasi 1

dengan penambahan tween 80 inilah yang dipakai sebagai sampel pembandingan uji antiproliferasi larutan ekstrak yang tidak dienkapsulasi dengan liposom.

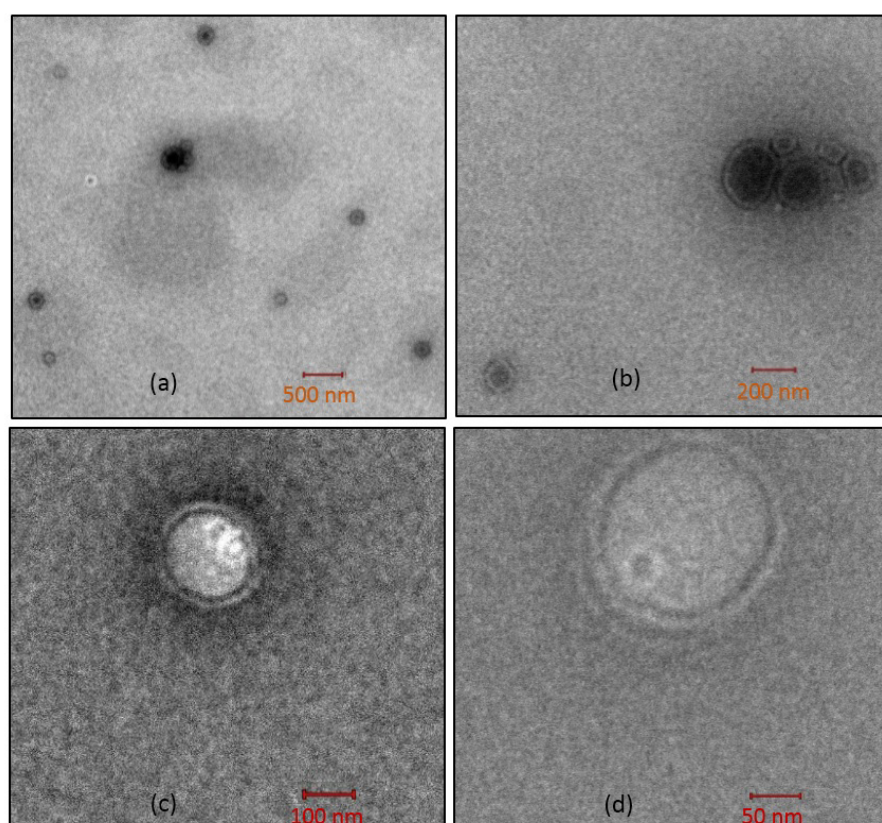
Morfologi bentuk liposom

Hasil TEM dapat dilihat pada Gambar 2. Dari hasil TEM, dapat dilihat bahwa liposom membentuk ukuran yang beragam. Pada gambar (a) dapat dilihat bahwa liposom ada

yang berukuran sekitar 100 nm, namun ada pula yang berukuran sekitar 250 nm dan terlihat menempel dengan beberapa liposom lainnya. Pada gambar (b) juga dapat dilihat bahwa ada beberapa liposom besar dengan ukuran sekitar 200 nm dan menempel satu sama lain. Pada gambar (c) dan (d) dapat dilihat bahwa juga ada liposom yang berukuran sekitar 100 nm. Adanya banyak perbedaan ukuran liposom yang terbentuk menandakan adanya distribusi ukuran partikel yang kurang baik, meskipun telah diekstrusi dengan membran 0,1 μm . Hal ini diperkirakan jumlah siklus ekstrusi yang sedikit sehingga hanya sedikit liposom yang mengecil ukurannya, dan juga diperkirakan karena struktur liposom yang terlalu fleksibel

sehingga ketika diekstrusi, liposom mudah kembali ke ukuran asalnya.

Dari hasil TEM dapat dilihat juga mengenai bentuk vesikel liposom yang terbentuk. Pada gambar (a) dan (b) dapat dilihat bahwa vesikel yang terbentuk merupakan LUV (*Large Unilamellar Vesicle*) karena memiliki ukuran lebih besar dari 100 nm, dan pada gambar (c) dan (d) dapat dilihat bahwa vesikel yang terbentuk merupakan MVV (*M.ulti Vesicullar Vesicle*) karena terbentuk vesikel yang lebih kecil di dalam vesikel utama yang lebih besar (Laouini, Jaafar-Maalej, Limayem-Blouza, Sfar, & Char, 2012).



Gambar 2. Hasil Transsmision Electron Microscopy liposom formulasi 1 dengan penambahan tween 80 dan telah diekstrusi membran 0,1 μm (a) pengenceran 20x dengan perbesaran 59000x (b) pengenceran 20x dengan perbesaran 59000x (c) pengenceran 50x dengan perbesaran 97000x, dan (d) pengenceran 50x dengan perbesaran 97000x

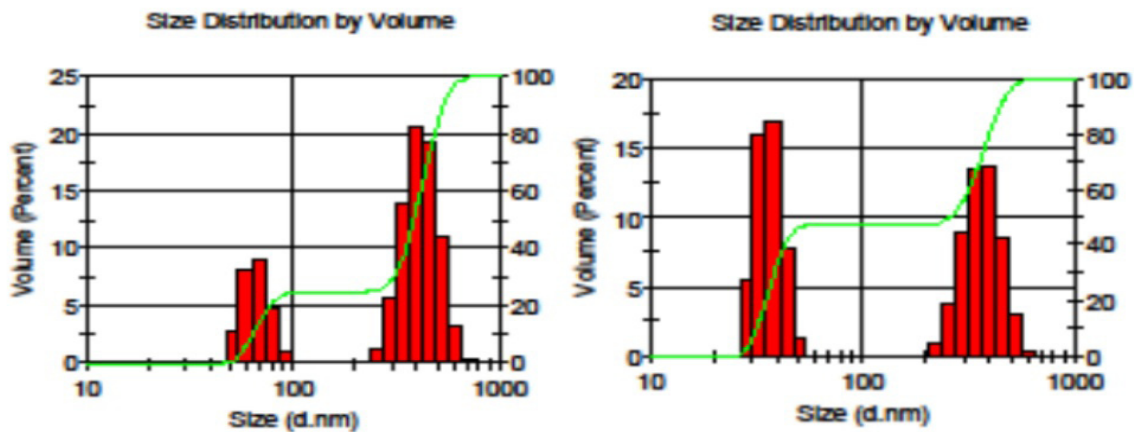
Distribusi ukuran partikel liposom

Pada Tabel 2 dan Gambar 3, dapat diketahui bahwa ukuran partikel liposom tanpa penambahan Tween 80 setelah diekstrusi dengan membran 400 nm dan 100 nm sebanyak 10 siklus masih berada pada rentang 422,7 nm sampai dengan 66,22 nm, dengan nilai diameter berdasarkan 90% distribusi adalah 526 nm. Angka tersebut didapat dari hasil pengukuran berdasarkan distribusi volume partikel. Hal tersebut menunjukkan bahwa distribusi ukuran partikel liposom masih kurang homogen, di mana seharusnya

setelah mengalami proses ekstrusi, partikel liposom yang didapatkan adalah partikel yang homogen dan mendekati ukuran pori membran ekstrusi (Hope, Nayar, Mayer, & Cullis, 1993). Hal tersebut disebabkan terjadinya agregrasi partikel pada liposom sehingga partikel kecil yang terbentuk beragregrat dengan partikel kecil lainnya dan membentuk partikel yang lebih besar. Adanya partikel yang beragregasi ini juga dapat dilihat pada analisa dengan TEM.

Tabel 2. Hasil pengukuran distribusi ukuran partikel liposom tanpa Tween 80 dan dengan Tween 80

Liposom	Peak 1 (nm)	%Volume	Peak 2 (nm)	%Volume
Tanpa Tween 80	422,7	83,23	66,22	10,7
Dengan Tween 80	371,5	75,77	36,36	5,1



Gambar 3. Grafik distribusi ukuran partikel liposom kurkumin tanpa tween 80 (kiri) dan dengan tween 80 (kanan)

Dari Tabel 2 juga dapat dilihat bahwa dengan penambahan tween 80, dapat diketahui bahwa ukuran partikel liposom dengan tween 80 setelah diekstrusi dengan membran 400 nm dan 100nm sebanyak 10 siklus berada pada rentang 371,5 nm sampai dengan 36,36

nm, dengan nilai diameter berdasarkan 90% distribusi adalah 445 nm. Dari data ini dapat dilihat bahwa liposom memiliki diameter ukuran partikel yang lebih kecil. Hal ini dikarenakan tween 80 dapat mencegah

kemungkinan liposom satu dengan yang lain saling beragregasi dan membentuk liposom yang lebih besar. Tween 80 dapat membantu kestabilan suspensi liposom dengan mekanisme stabilisasi sterik. Dimana pada stabilisasi sterik, surfaktan menjadi *barrier* antar partikel yang mencegah partikel mendekati partikel lainnya dan hal tersebut mencegah partikel memiliki gaya tarik-menarik van der Waals.

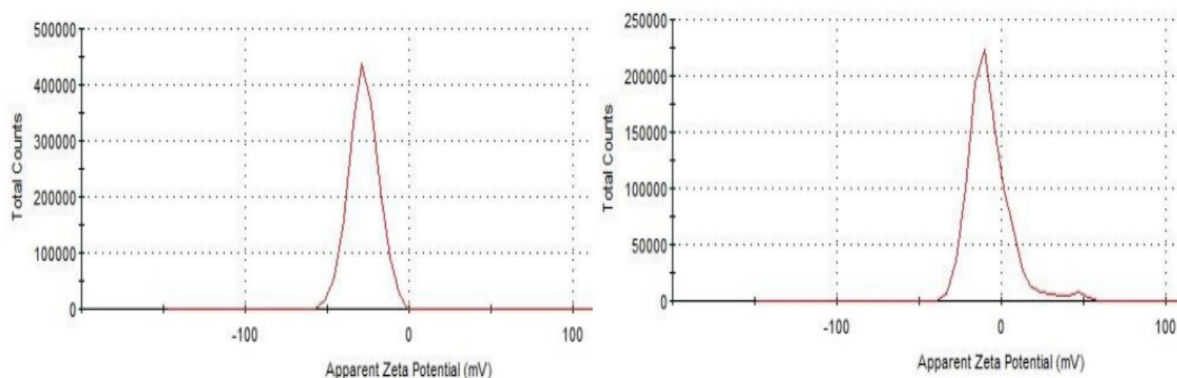
Potensial zeta

Nilai pH pada suatu suspensi bergantung pada pH sampel. Pada pH di antara 4-7,5

nilai potensial zeta suspensi dikatakan stabil adalah nilai potensial zeta yang menjauhi titik isoelektrik yaitu 0 dan berada lebih positif dari +30 mV dan lebih negatif dari -30 mV (Malvern, n.d.).

Tabel 3. Hasil pengukuran zeta potensial liposom tanpa tween 80 dan dengan tween 80

Liposom	Zeta Potensial (mV)
Tanpa Tween 80	-27,7
Dengan Tween 80	-7,51



Gambar 4. Grafik distribusi potensial zeta liposom kurkumin tanpa tween 80 (kiri) dan dengan tween 80 (kanan)

Pada Tabel 3 diketahui bahwa potensial zeta dari kedua sampel liposom tanpa tween 80 dan dengan tween 80 berada pada rentang +30 dan -30 mV, yaitu berturut-turut -27,7 dan -7,51 mV. Dari hasil ini dapat dilihat bahwa kedua sampel masih kurang stabil. Hal ini dikarenakan tween 80 merupakan surfaktan non-ionik, dimana penambahan tween 80 ke dalam formulasi tidak membuat nilai zeta bertambah negatif. Oleh karena itu, sebaiknya ditambahkan surfaktan ionik ke

dalam formulasi liposom untuk menambah nilai potensial zetanya.

Efisiensi penjerapan liposom

Efisiensi penjerapan liposom dievaluasi dengan metode dialisis dengan menggunakan membran selofan. Pada alat dialisis, bagian donor dimasukkan sampel liposom sebanyak 0,5 mL dan bagian akseptor dimasukkan dapar fosfat pH 7,4 sebanyak 0,5 mL. Alat dialisis diputar selama 38 jam dan pada jam

ke 8, 16, 24 dan 38 larutan akseptor tersebut diambil dan diganti dengan dapar fosfat pH 7,4 yang baru.

Hasil larutan akseptor yang pertama diambil mengalami perubahan warna buffer dari bening menjadi sedikit kuning. Hal ini disebabkan karena sebagian ekstrak yang tidak terjerap liposom sudah berpindah ke larutan buffer. Pada hasil pengambilan larutan akseptor yang kedua, juga terjadi perubahan warna menjadi sedikit kuning walaupun tidak sepekat pengambilan pertama. Pada hasil pengambilan larutan akseptor yang ketiga dan keempat, larutan akseptor sudah berwarna bening jernih dengan tidak ada bias warna kuning.

Setelah proses dialisis selesai, semua larutan donor dilarutkan dengan metanol dengan faktor pengenceran sebanyak 50x. Larutan donor merupakan liposom yang sudah dimurnikan dari ekstrak bebas dan vesikel liposom tersebut dihancurkan dengan metanol agar dapat menganalisa jumlah ekstrak yang terenkapsulasi dengan liposom. Larutan tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 419 nm. Hasil serapan yang terbaca adalah 0,170. Serapan dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear kurva kalibrasi ($y=0,050208-0,00176$) dan dihitung kadar ekstrak yang terenkapsulasi. Dari hasil perhitungan, didapatkan bahwa efisiensi penjerapan liposom adalah 63,80%. Pada penelitian yang dilakukan oleh Yunianto (2007), efisiensi penjerapan dari kurkumin di

dalam liposom adalah 84,55%. Nilai efisiensi penjerapan pada penelitian kami lebih kecil disebabkan kami menggunakan ekstrak kunyit, bukan senyawa kurkumin murni seperti yang dilakuka oleh Yunianto (2007).

Uji aktivitas antiproliferasi liposom dan larutan ekstrak etanol kunyit

Untuk keperluan pengujian sampel ekstrak yang dienkapsulasi dengan liposom maupun yang tidak dienkapsulasi dengan liposom pada sel kanker secara *in vitro*, pembuatan sampel secara steril perlu dilakukan. Hal ini perlu dilakukan untuk mengurangi kemungkinan adanya bakteri atau kontaminan lainnya yang diperkirakan mengkontaminasi sampel dan mengakibatkan kematian sel kanker bukan karena sampel yang diuji (Toh & Gigi, 2013).

Pembuatan liposom ekstrak etanol kunyit secara steril dilakukan dengan cara aseptis dan filtrasi. Sterilisasi dengan metode aseptis dan filtrasi dipilih karena metode ini merupakan metode yang paling optimal dalam hal menjaga liposom dari kondisi optimalnya. Sterilisasi dengan autoklaf dikhawatirkan dapat menyebabkan bahan seperti fosfatidilkolin dan ekstrak kunyit dapat rusak dan terdegradasi pada suhu yang tinggi. Vesikel yang terbentuk pada liposom juga dikhawatirkan rusak karena pemanasan jika disterilisasi dengan autoklaf. Hasil uji antiproliferasi liposom ekstrak kunyit dan ekstrak kunyit dapat dilihat pada Tabel 4 dan 5. Untuk perhitungan nilai IC_{50} , beberapa data dipilih guna menghasilkan

Tabel 4. Hasil uji antiproliferasi liposom ekstrak kunyit

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Penghambatan Proliferasi (%)
0,536	-0,31
1,072	7,138
5,36	0,138
10,72	3,207
53,6	60,414
107,2	89,759

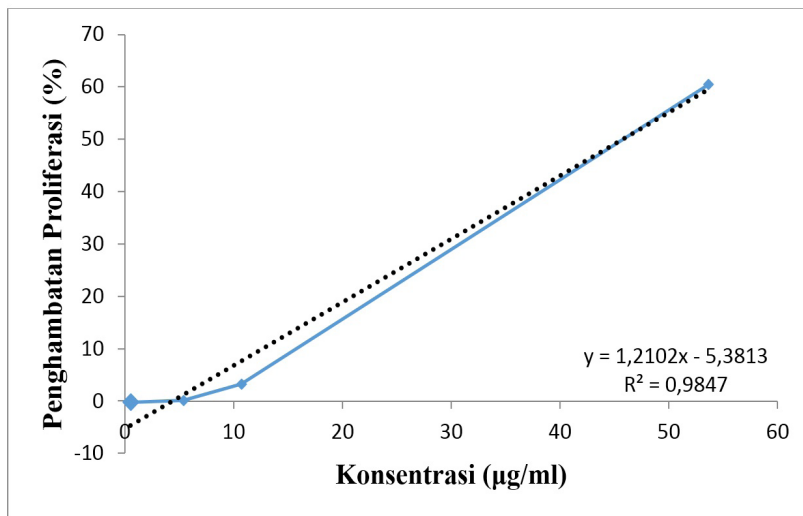
grafik yang linear. Setelah dibuat grafiknya, nilai IC_{50} dapat dihitung dengan persamaan garis yang terbentuk.

Grafik aktivitas antiproliferasi dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6. Berdasarkan hasil persamaan garis pada grafik tersebut, diperoleh nilai IC_{50} liposom adalah 45,762 $\mu\text{g/ml}$ dan nilai IC_{50} ekstrak adalah 36,399 $\mu\text{g/ml}$. Dari data ini dapat dilihat bahwa ekstrak yang tidak dienkapsulasi dengan liposom memiliki aktivitas antiproliferasi

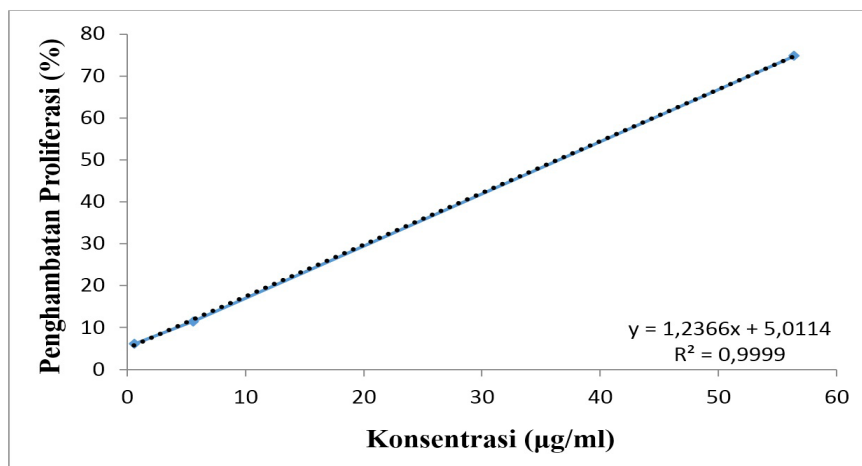
yang lebih tinggi dibanding ekstrak yang dienkapsulasi dengan liposom dan hal ini juga membuktikan bahwa enkapsulasi dengan liposom berpengaruh kepada aktivitas antiproliferasi dari ekstrak kunyit tersebut. Adanya data IC_{50} tersebut sebenarnya tidak terlalu signifikan karena konsentrasi pengenceran yang dilakukan tidak berdasarkan deret geometrik ataupun aritmatik.

Tabel 5. Hasil uji antiproliferasi larutan ekstrak kunyit

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Penghambatan Proliferasi (%)
0,564	6,103
1,128	8,69
5,64	11,552
11,28	15,552
56,4	74,793
112,8	98,793



Gambar 5. Grafik perbandingan antara konsentrasi dan persentase penghambatan proliferasi dari liposom ekstrak kunyit



Gambar 6. Grafik perbandingan antara konsentrasi dan persentase penghambatan proliferasi dari larutan ekstrak kunyit

Pada penelitian sebelumnya, uji aktivitas antiproliferasi ekstrak n-heksana kunyit pada sel kanker menunjukkan nilai IC_{50} ekstrak sebesar 260 µg/ml (Mohammad, Nosratollah, & Rahmat, 2010). Pada penelitian ini, aktivitas antiproliferasi ekstrak etanol kunyit menunjukkan nilai IC_{50} yaitu 36,399 µg/ml dan pada liposom ekstrak etanol kunyit menunjukkan nilai IC_{50} yaitu 45,762 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antiproliferasi ekstrak etanol kunyit dan

liposomnya memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan ekstrak n-heksana kunyit. Pengaruh enkapsulasi ekstrak dengan liposom yang terjadi adalah ekstrak menjadi membutuhkan waktu yang lebih lama untuk memberikan efek kepada sel kanker payudara T47D. Hal ini dikarenakan oleh jenis vesikel liposom yang terbentuk adalah MVV atau *Multi Vesicular Liposom*, dimana pada jenis vesikel liposom ini terdapat vesikel kecil yang terbentuk di dalam vesikel yang lebih besar.

Hal ini membuat ekstrak harus menunggu lebih lama untuk proses meleburnya (fusi) membran bilayer liposom, yang terdiri dari lebih dari satu membran bilayer, dengan membran sel kanker payudara T47D. Hal ini dapat dibuktikan dengan melihat morfologi partikel melalui TEM.

Pengaruh enkapsulasi tersebut juga diperkirakan terjadi karena waktu kontak antara liposom ekstrak dengan sel kanker payudara T47D yang kurang lama sehingga membran bilayer liposom belum melebur (fusi) dengan sempurna dan ekstrak yang terenkapsulasi belum secara sempurna memberikan efek antiproliferasi pada sel kanker payudara T47D. Adanya perlakuan enkapsulasi dengan liposom pada suatu obat memang memperlambat pelepasan obat ke sel dibanding dengan obat bebas. Hal ini dikarenakan obat dilindungi oleh membran fosfatidilkolin bilayer.

KESIMPULAN

Dalam penelitian ini kami menemukan bahwa ekstrak etanol kunyit yang dienkapsulasi ke dalam liposom memiliki aktivitas antiproliferasi yang lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak etanol kunyit bebas. Hal tersebut menunjukkan bahwa pembuatan liposom dapat mengurangi sitotoksitas dari ekstrak etanol kunyit.

DAFTAR ACUAN

- Aggarwal, B. B., Kumar, A., & Bharti, A. C. (2003). Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 363-398
- Anupama, M., Murgan, S. S., Murthy, & Blakrishna, P. (2008). Broccoli Flower Head Extract Reduces Mitomycin-C Induced Sister Chromatid Exchange in Cultured Human Lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 3351-3353
- (2011). *Chemotherapy and You*. United States: National Cancer Institutes
- Global Cancer Facts & Figures*. (2011). Atlanta: American Cancer Society
- Hope, M. J., Nayar, R. D., Mayer, L. D., & Cullis, P. (1993). Reduction of Liposome Size and Preparation of Unilamellar Vesicles by Extrusion Techniques. In *Liposome Technology*. New York: Informa Healthcare
- Laouini, Jaafar-Maalej, Limayem-Blouza, Sfar, & Char. (2012). *Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art*. American Scientific Publishers
- Limei, Y., Zhao, M., Yang, B., & Bai, W. (2009). Immunomodulatory and Anticancer Activities of Phenolics from *Garcinia Mangostana* Fruit Pericarp. *Food Chemistry*, 969-973
- Malvern. (n.d). Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes. *Malvern Instruments, Ltd.*, 1-6
- Martin, A., Swarbrick, J., & Cammara, A. (2008). *Farmasi Fisik: Dasar-Dasar*

- Kimia Fisik dalam Ilmu Farmasetik*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia
- Mohammad, P., Nosratollah, Z., & Rahmat. (2010). The Inhibitory Effect of Curcuma longa Extract on Telomerase Activity in A549 Lung Cancer Cell Line. *African Journal of Biotechnology*, 9, 912-919
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Qui, M. E. (Eds.). (2005). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association
- Rukmana, R. H. (1994). *Kunyit*. Yogyakarta: Kanisius
- Toh, M.-R., & Gigi, N. C. (2013). Liposomes as Sterile Preparations and Limitations of Sterilization Techniques in Liposomal Manufacturing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88-95
- WHO. (2014). Retrieved December 26, 2014, from http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/
- Yunianto, E. P. (2007). *Formulasi liposom curcumin menggunakan metode hidrasi lapis tipis*. Depok: Universitas Indonesia.