

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



**PENGEMBANGAN DAN UJI BIODISTRIBUSI KOMBINASI OBAT
PRIMAKUIN DAN KLOROKUIN YANG DIENKAPSULASI DALAM
STEALTH LIPOSOME GUNA PENANGANAN INFEKSI MALARIA
FASE HEPATIK**

TAHUN KE -1 DARI RENCANA 2 TAHUN

ANDANG MIATMOKO, Ph.D., Apt.	0002108503
Dr. RETNO SARI, M.Sc., Apt.	0008106303
FEBRI ANNURYANTI, M.Sc., Apt.	0012128401
ESTI HENDRADI, M.Si., Ph.D., Apt.	0014115703

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)

KKB
 Kc-2
 LP 114/19
 Pen



PENGEMBANGAN DAN UJI BIODISTRIBUSI KOMBINASI OBAT
PRIMAKUIN DAN KLOOROKUIN YANG DIENKAPSULASI DALAM
***STEALTH LIPOSOME* GUNA PENANGANAN INFEKSI MALARIA**
FASE HEPATIK

TAHUN KE -1 DARI RENCANA 2 TAHUN

ANDANG MIATMOKO, Ph.D., Apt.	0002108503
Dr. RETNO SARI, M.Sc., Apt.	0008106303
FEBRI ANNURYANTI, M.Sc., Apt.	0012128401
ESTI HENDRADI, M.Si., Ph.D., Apt.	0014115703

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Pengembangan dan uji biodistribusi kombinasi obat primakuin dan klorokuin yang dienkapsulasi dalam stealth liposome guna penanganan infeksi malaria fase hepatic

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : ANDANG MIATMOKO, Ph.D, S.Farm, Apt,
M.Pharm.Sc
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0002108503
Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
Program Studi : Farmasi
Nomor HP : 081332983767
Alamat surel (e-mail) : andang-m@ff.unair.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr. Dra RETNO SARI Apt, M.Sc.
NIDN : 0008106303
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : FEBRI ANNURYANTI S.Farm, Apt, M.Sc.
NIDN : 0012128401
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (3)

Nama Lengkap : Dra ESTI HENDRADI M.Si, Ph.D
NIDN : 0014115703
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 250,000,000

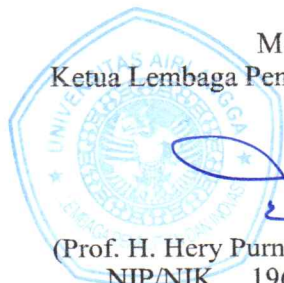


Mengetahui,
Dean Fakultas Farmasi UNAIR

(Dr. Umi Athijah, MS., Apt)
NIP/NIK 19564071981032001

Kota Surabaya, 14 - 11 - 2018
Ketua,

(ANDANG MIATMOKO, Ph.D, S.Farm, Apt,
M.Pharm.Sc)
NIP/NIK 198510022008121001



Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi UNAIR

(Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.)
NIP/NIK 196705071991021001

RINGKASAN

Malaria merupakan penyakit endemik daerah sub-tropis dan tropis yang disebabkan oleh gigitan nyamuk *Anopheles* sp. betina yang terinfeksi *Plasmodium* sp. Tahapan penyakit malaria sangat kompleks dan di antara tahapan tersebut, fase hepatic menjadi titik krusial. Sampai saat ini, terapi pengobatan untuk infeksi malaria fase hepatic masih terbatas pada penggunaan primakuin (PQ). Durasi pengobatan yang panjang serta derajat toksisitas obat yang tinggi membatasi efikasi pengobatan dengan menggunakan PQ. Hal ini menjadi hambatan terapi malaria secara efektif serta menyebabkan terjadinya resistensi obat pada terapi malaria.

Terapi infeksi malaria yang komprehensif diusulkan melalui upaya penggunaan kombinasi PQ dan klorokuin (CQ), dimana CQ telah dilaporkan dapat meningkatkan efektifitas terapi PQ melalui hambatan metabolisme PQ yang menghasilkan perubahan profil farmakokinetik PQ dan penurunan efek toksiknya. Selain itu, penggunaan kombinasi PQ dan CQ dalam sediaan liposom juga dimaksudkan sebagai terapi ganda, dimana PQ ditujukan sebagai terapi untuk membunuh sporozoit dan hipnozoit *Plasmodium* sp. pada infeksi fase hepatic, sementara penggunaan CQ diharapkan dapat memberikan efek profilaksis terhadap kemungkinan terbentuknya merozoit yang dapat menyebabkan infeksi malaria fase eritrositik. Pada infeksi malaria fase hepatic, sporozoit yang masuk ke dalam tubuh secara spesifik hanya akan menyerang sel hepatosit daripada sel-sel non-parenkim lainnya di hepar. Dengan demikian, hantaran obat yang spesifik ditujukan untuk sel hepatosit akan bermanfaat untuk peningkatan efektifitas terapi serta penurunan toksisitas PQ dan CQ. Oleh karena itu, untuk meningkatkan hantaran dan efikasi kedua obat tersebut, liposom akan digunakan sebagai pembawa obat.

Pada penelitian ini, telah dilakukan tahapan formulasi tunggal liposom primakuin dan liposom tunggal klorokuin sebagai pengembangan awal formulasi liposom kombinasi primakuin dan klorokuin. Liposom dibuat dengan komposisi lipid HSPC, kolesterol, DSPE-mPEG₂₀₀₀ dengan rasio molar sebesar 55:40:5 menggunakan metode lapis tipis. Penjebakan obat dilakukan dengan menggunakan pH gradien transmembran, dimana pH intraliposom 5,0 dengan buffer sitrat, dan pH 7,4 untuk fase ekstraliposom. Liposom yang dibuat kemudian diamati ukuran partikel, ζ -potensial, dan efisiensi enkapsulasi untuk menentukan suhu inkubasi, waktu inkubasi, dan rasio obat:lipid yang optimal.

Pada optimasi penentuan suhu inkubasi, diperoleh data bahwa efisiensi enkapsulasi semakin meningkat seiring dengan peningkatan suhu inkubasi. Adapun dengan waktu inkubasi sekitar 20 menit, dihasilkan liposom dengan efisiensi enkapsulasi relatif lebih tinggi dibandingkan yang lain. Pada optimasi penentuan rasio obat:lipid untuk pembuatan liposom klorokuin, hasil menunjukkan bahwa peningkatan rasio obat:lipid akan meningkatkan efisiensi enkapsulasi. Hal ini berbanding terbalik dengan hasil yang ditunjukkan pada liposom primakuin yaitu efisiensi enkapsulasi akan semakin besar apabila rasio obat:lipid semakin kecil. Adapun ukuran partikel yang dihasilkan pada seluruh formula berkisar antara 121,0 nm sampai 175,8 nm, dengan nilai PDI antara 0,150 sampai 0,569, dan dengan nilai ζ potential antara -34,55 mV sampai -7,35 mV. Dari hasil tersebut diatas, suhu inkubasi yang optimal adalah 60°C dengan waktu inkubasi selama 20 menit, dengan rasio obat:lipid liposom klorokuin adalah 1:3, sedangkan pada liposom primakuin adalah 1:10 yang memiliki efisiensi enkapsulasi paling tinggi. Kondisi optimal ini digunakan untuk pembuatan liposom kombinasi primakuin dan klorokuin.

Pada pembuatan liposom kombinasi, PQ dan CQ ditambahkan pada rasio massa yang berbeda, yaitu 1:1 (P1C1), 1:3 (P1C3), dan 1:5 (P1C5). Dari penelitian ini diperoleh hasil pemeriksaan ukuran partikel formula liposom PQ tunggal (P1C0), liposom CQ tunggal

(P0C1), liposom kombinasi PQ dan CQ (P1C1, P1C3, P1C5) berturut-turut sebesar $175,8 \pm 27,06$; $149,1 \pm 27,40$; $96,7 \pm 6,65$; $172,3 \pm 21,88$; dan $102,4 \pm 3,72$. Hasil PDI yang didapatkan untuk formula P0C1 adalah sebesar $0,21 \pm 0,02$. Hal ini menunjukkan ukuran partikel dari sediaan yang homogen. Sedangkan nilai PDI untuk formula P1C0, P1C1, P1C3, P1C5 secara berturut-turut adalah sebesar $0,34 \pm 0,05$; $0,39 \pm 0,02$; $0,32 \pm 0,01$, dan $0,34 \pm 0,06$. Nilai PDI >3 menunjukkan polidispersitas yang tinggi dan distribusi ukuran partikel liposom yang masih heterogen. Selain itu, nilai zeta potensial untuk seluruh formula diperoleh nilai yang berkisar antara $-22,11 \pm 3,32$ sampai $-9,70 \pm 4,01$ mV.

Hasil pengukuran % efisiensi enkapsulasi liposom tunggal PQ (P1C0) menunjukkan nilai sebesar $75\% \pm 0,089$, formula P0C1 sebesar $56\% \pm 0,15$. Sedangkan untuk liposom kombinasi formula P1C1 sebesar 7% untuk PQ dan 27% untuk CQ, formula P1C3 sebesar $20\% \pm 0,037$ untuk PQ dan $16\% \pm 0,014$ untuk CQ, formula P1C5 sebesar $16\% \pm 0,028$ untuk PQ dan $12\% \pm 0,01$ untuk CQ.

Selanjutnya, telah dilakukan uji pelepasan obat dari liposom dengan menggunakan media *phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,4. Dari hasil uji tersebut, didapatkan hasil jumlah kumulatif obat terlepas (%) pada jam ke 48, untuk liposom tunggal formula P1C0 adalah sebesar 41,69%, dan formula P0C1 sebesar 48,91%. Sedangkan untuk liposom kombinasi formula P1C1 adalah sebesar 43,95% untuk PQ dan 27,73% untuk CQ. Profil pelepasan liposom kombinasi menunjukkan pelepasan yang relatif lebih lambat dibandingkan dengan liposom tunggal.

Dari hasil karakterisasi dan pelepasan liposom primakuin dan klorokuin, dapat disimpulkan bahwa penggunaan kombinasi primakuin dan klorokuin dalam satu formulasi liposom menurunkan efisiensi enkapsulasi PQ dan CQ ke dalam liposom dan memperlambat pelepasannya.

PRAKATA

Segala puji syukur bagi Allah SWT, Tuhan semesta alam, yang telah memberikan kelancaran, kemudahan, kekuatan, dan segala petunjuk sehingga penelitian **“Pengembangan dan uji biodistribusi kombinasi obat primakuin dan klorokuin yang dienkapsulasi dalam *stealth liposome* guna penanganan infeksi malaria fase hepatic”** ini dapat dilaksanakan dengan baik.

Penelitian ini merupakan kegiatan penelitian yang didanai oleh DRPM Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi (Kemendikristekdikti) melalui Program Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi tahun 2018.

Dalam kesempatan ini, kami menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi UNAIR, Prof. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.; Dekan Fakultas Farmasi UNAIR, Dr. Umi Athiyah, MS., Apt; Ketua Komisi Penelitian Fakultas Farmasi UNAIR, Drs. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D, Apt.; serta pada semua pihak yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan penelitian ini terutama para mahasiswa dan laboran.

Akhir kata, kami semua anggota tim berharap semoga penelitian ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya bidang formulasi obat.

Surabaya, November 2018

Peneliti

DAFTAR ISI

RINGKASAN.....	iii
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang.....	1
BAB 2. STUDI PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan mengenai penyakit malaria.....	5
2.2 Penggunaan PQ sebagai obat untuk terapi malaria.....	6
2.3 Penggunaan CQ yang dikombinasikan dengan PQ pada terapi malaria.....	7
2.4 Liposom sebagai pembawa obat pada terapi malaria.....	8
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	11
3.1 Tujuan Penelitian	11
3.2 Manfaat Penelitian	11
BAB 4. METODE PENELITIAN	12
4.1. Bahan	12
4.2. Alat.....	12
4.3. Identifikasi kualitatif bahan	12
4.4. Pembuatan liposom dan evaluasi efisiensi pengebakan obat.....	13
4.5. Evaluasi pengukuran ukuran partikel, zeta potensial, dan stabilitas liposom.....	16
4.6. Studi pelepasan obat <i>in vitro</i>	16
4.7. Penetapan Kadar PQ dan CQ.....	16
4.8. Analisis data.....	17
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	18
5.1 Identifikasi Kualitatif PQ.....	18
5.2 Identifikasi Kualitatif CQ.....	18
5.3 Kurva Baku PQ dan CQ untuk penetapan kadar obat bebas.....	19
5.4 Kurva baku PQ dan CQ untuk penetapan kadar obat dalam liposom (dengan penambahan metanol).....	20

5.5	Penetapan kadar untuk kombinasi PQ dan CQ.....	22
	23
5.6	Ukuran partikel dan zeta potensial liposom.....	24
5.7	Efisiensi enkapsulasi liposom.....	30
5.8	Hasil pelepasan primakuin dan klorokuin dari sistem liposom.....	32
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA.....		35
6.1	Karakterisasi termodinamika liposom kombinasi PQ dan CQ menggunakan analisis kalorimetri.....	35
6.2	Evaluasi biodistribusi obat pada mencit.....	35
6.3	Pembuatan liposom yang dikonjugasikan dengan ligan target.....	35
6.4	Evaluasi ambilan liposom kombinasi PQ dan CQ oleh sel hepatosit.....	35
6.5	Evaluasi profil farmakokinetika dan distribusi obat.....	36
6.6	Evaluasi aktivitas antimalaria fase eritrositik dari liposom kombinasi PQ-CQ.....	36
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN.....		37
7.1	Kesimpulan.....	37
7.2	Saran.....	37
DAFTAR PUSTAKA.....		38
LAMPIRAN 1.....		42

DAFTAR TABEL

Tabel IV.1 Formula liposom untuk optimasi waktu dan suhu inkubasi	13
Tabel IV.2 Formula liposom untuk optimasi rasio lipid:obat CQ	15
Tabel IV.3 Formula liposom kombinasi PQ dan CQ.....	15
Tabel V.1 Hasil uji organoleptis PQ.....	18
Tabel V.2 Spektrum FTIR PQ.	18
Tabel V.3 Hasil uji organoleptis CQ.....	18
Tabel V.4 Spektrum FTIR CQ.....	19
Tabel V.5 Kurva baku PQ dengan menggunakan metode spektrofotometri pada λ :282 nm..	19
Tabel V.6 Kurva baku klorokuin dengan menggunakan metode spektrofotometri UV pada λ =330 nm.....	20
Tabel V.7 Kurva baku PQ yang dibuat dengan penambahan metanol menggunakan metode spektrofotometri UV pada λ =282 nm.....	21
Tabel V.8 Kurva baku CQ yang dibuat dengan penambahan metanol menggunakan metode <i>spectrofotometri uv-vis</i> dengan λ :330 nm.	21
Tabel 0.9	21
Tabel V.10 Ukuran partikel, nilai PDI, nilai zeta potensial liposom CQ dan liposom PQ yang dibuat dengan inkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit.	27
Tabel V.11 Efisiensi enkapsulasi (%) liposom CQ yang dibuat pada rasio massa obat:lipid 1:5 pada suhu dan waktu inkubasi yang berbeda.	30
Tabel V.12 Efisiensi enkapsulasi (%) liposom PQ yang diinkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit (n=3).....	31
Tabel V.0.13 Efisiensi enkapsulasi (%) liposomCQ yang diinkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit (n=3).....	31
Tabel V.14 Efisiensi enkapsulasi (%) liposom PQ tunggal (P1C0), liposom CQ tunggal (P0C1) dan liposom kombinasi PQ+CQ (P1C1, P1C3, dan P1C5) yang dianalisis dengan menggunakan metode spektrofotometri UV.....	32
Tabel V.15 Jumlah kumulatif PQ dan CQ yang terlepas dari sediaan liposom dengan menggunakan metode dialisis menggunakan media PBS pH 7,4 pada suhu 37°C.....	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Siklus hidup <i>Plasmodium</i> sp. pada manusia	5
Gambar 2.2 Struktur kimia primakuin bisfosfat (PQ).....	6
Gambar 2.3 Struktur kimia klorokuin difosfat (CQ).....	7
Gambar 2.4 Ilustrasi bentukan vesikel liposom.	9
Gambar 4.1 Skema pembuatan liposom.....	14
Gambar 5.1 Grafik linearitas kurva baku PQ yang diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri pada $\lambda=282$ nm.....	19
Gambar 5. 2 Kurva baku klorokuin dengan menggunakan metode Spectrofotometri UV pada $\lambda:330$ nm.	20
Gambar 5.3 Kurva baku PQ yang dibuat dengan penambahan metanol menggunakan metode spektrofotomeri UV pada :282 nm.....	21
Gambar 5.4 Kurva baku CQ yang dibuat dengan penambahan metanol menggunakan metode spectrofotometri UV dengan $\lambda:330$ nm.....	22
Gambar 5.5 Profil spektra derivatif order 1 $\Delta\lambda$ (N) 1 PQ dan CQ pada berbagai kadar.....	22
Gambar 5.6 Kurva baku kombinasi PQ dan CQ dalam PBS pH 7,4 yang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis derivatif order 1 $\Delta\lambda$ (N) 1 pada λ : 280nm.	23
Gambar 5.7 Kurva baku kombinasi PQ dan CQ dalam PBS pH 7,4 yang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV derivatif order 1 $\Delta\lambda$ (N) 1 pada λ : 346nm.	23
Gambar 5.8 Kurva baku kombinasi PQ dan CQ dalam PBS pH 7,4 dengan penambahan metanol yang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis derivatif order 1 $\Delta\lambda$ (N) 1 pada $\lambda = 280$ nm.....	24
Gambar 5.9 Kurva baku kombinasi primakuin dan klorokuin dalam pH 7,4 dengan penambahan methanol yang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV derivatif order 1 $\Delta\lambda$ (N) 1 pada λ : 346nm.....	24
Gambar 5.10 Histogram nilai rata-rata ukuran partikel liposom PQ tunggal (P1C0), liposom CQ tunggal (P0C1) dan liposom kombinasi PQ+CQ (P1C1, P1C3, dan P1C5) pada T = 25°C (n=3).	28
Gambar 5.11 Histogram nilai rata-rata PDI liposom PQ tunggal (P1C0), liposom CQ tunggal (P0C1) dan liposom kombinasi PQ+CQ (P1C1, P1C3, dan P1C5) pada T = 25°C (n=3).	29
Gambar 5.12 Histogram nilai rerata zeta potensial liposom PQ tunggal (P1C0), liposom CQ tunggal (P0C1) dan liposom kombinasi PQ+CQ (P1C1, P1C3, dan P1C5) pada T = 25°C (n=3).....	29
Gambar 5.13 Efisiensi enkapsulasi (%) liposom CQ yang dibuat pada rasio massa obat:lipid 1:5 pada suhu dan waktu inkubasi yang berbeda (n=3).....	30
Gambar 5.14 Efisiensi enkapsulasi (%) liposom CQ dan liposom PQ pada suhu 60°C dengan waktu 20 menit (n=3).....	31
Gambar 5.15 Histogram nilai EE rata-rata liposom PQ tunggal (P1C0), liposom CQ tunggal (P0C1) dan liposom kombinasi PQ+CQ (P1C1, P1C3, dan P1C5) (n=3).....	32
Gambar 5.16 Profil pelepasan PQ dari liposom PQ tunggal (P1C0) dan liposom kombinasi PQ dan CQ (P1C1) menggunakan media PBS pH 7,4 pada suhu 37°C.....	33
Gambar 5.17 Profil pelepasan CQ dari liposom CQ tunggal (P0C1) dan liposom kombinasi PQ dan CQ (P1C1) menggunakan media PBS pH 7,4 pada suhu 37°C.....	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Draft artikel Ilmiah.....41



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Malaria merupakan penyakit endemik daerah sub-tropis dan tropis dengan angka kematian yang tinggi. Di dunia, malaria menempati urutan keempat penyakit infeksi paling mematikan setelah infeksi pneumokokal akut pada saluran pernafasan, HIV/AIDS, dan tuberkulosis (Mishra *et al.*, 2017). Sementara itu, di Indonesia, jutaan kasus infeksi malaria terjadi dengan tingkat kematian sekitar 40 ribu jiwa per tahun (The Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013). Malaria disebabkan oleh infeksi parasit dari genus *Plasmodium* sp. yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* sp. betina yang terinfeksi. Ketika nyamuk menghisap darah, sporozoit yang terakumulasi di kalenjar ludah nyamuk akan masuk ke dalam tubuh melalui kulit, lalu berpenetrasi masuk ke dalam peredaran darah. Dalam waktu yang sangat singkat, sporozoit ini akan menuju ke liver dan menginfeksi sel hepatosit, mengakibatkan infeksi fase hepatic. Tahapan ini sangat penting dikarenakan merupakan titik awal perkembangan infeksi malaria menjadi malaria fase eritrositik dan malaria serebral yang mematikan (Prudêncio, Rodriguez and Mota, 2006). Selain itu, pada infeksi oleh *Plasmodium ovale* dan *Plasmodium vivax*, sporozoit juga dapat berkembang menjadi fase laten hipnozoit, yang dapat menyebabkan relaps infeksi malaria pada sekitar 50-80% mantan penderita (Chu and White, 2016).

Primakuin (PQ) merupakan pengobatan utama untuk penanganan infeksi malaria fase hepatic (Longley *et al.*, 2016). PQ adalah senyawa *pro-drug* antimalaria yang termasuk ke dalam golongan 8-amino kuinolin dan bekerja aktif terhadap sporozoit, hipnozoit, fase aseksual, dan gametosit melalui hambatan aktivitas metabolik mitokondria parasit dan produksi metabolit reaktif yang bersifat toksik terhadap sel (Chu and White, 2016; Marcsisin, Reichard and Pybus, 2016). PQ merupakan obat dengan waktu paruh yang pendek, dimana obat ini dimetabolisme dengan cepat di hepar menjadi derivat asam karboksilat yang diekskresikan secara cepat melalui urin. Untuk memperoleh efek pengobatan dan pencegahan relaps malaria setelah pengobatan, PQ harus dikonsumsi selama 14 hari (Karyana *et al.*, 2016).

Walaupun PQ memiliki efektivitas yang baik untuk infeksi malaria fase hepatic, obat ini dapat menyebabkan methemoglobinemia dan hemolisis pada penderita yang mengalami defisiensi *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6PD) (Kedar *et al.*, 2014; Recht *et al.*, 2015; Marcsisin, Reichard and Pybus, 2016). Selain itu, durasi pengobatan yang panjang juga

dapat menyebabkan kram perut, mual, dan muntah (Jong and Nothdurft, 2001). Hal inilah yang menyebabkan derajat kepatuhan minum obat pasien menurun sehingga menyebabkan kadar PQ yang rendah dalam darah. Pada kasus malaria, penggunaan obat dosis rendah pada kasus parasitemia yang tinggi dapat menyebabkan resistensi obat yang seringkali menimbulkan masalah pada program pengendalian penyakit malaria (Gonzalez-Ceron *et al.*, 2015).

Klorokuin (CQ) merupakan senyawa 4-amino kuinolin yang seringkali digunakan untuk terapi malaria pada fase eritrositik (World Health Organization, 2015). Telah dilaporkan bahwa penggunaan PQ yang dikombinasikan dengan CQ mampu memberikan hasil terapi malaria yang efektif. Kombinasi pemberian CQ selama tiga hari berturut-turut dan PQ selama 14 hari mampu mengobati infeksi malaria fase eritrositik dan mencegah relaps infeksi malaria secara efektif (Gonzalez-Ceron *et al.*, 2015; World Health Organization, 2015). Selain itu, penggunaan PQ yang dikombinasikan dengan CQ menunjukkan adanya penurunan toksisitas PQ tanpa mengurangi efektifitasnya terhadap parasit (Fasinu *et al.*, 2016). Hasil penelitian menunjukkan bahwa CQ dapat menghambat metabolisme PQ oleh CYP2D6 sehingga menurunkan pembentukan metabolit aktif yang bersifat toksik terhadap eritrosit.

Penggunaan obat yang rasional sangat penting untuk penanganan penyakit malaria dimana regimentasi dosis terapi sangat erat kaitannya dengan kasus resistensi obat malaria. Dengan mempertimbangkan jumlah pengembangan obat malaria yang masih terbatas, maka pengembangan terapi obat yang lebih efektif serta tidak toksik mutlak diperlukan. Penggunaan nanopartikel sebagai pembawa obat telah memberikan terobosan baru pada pengobatan malaria, dimana efektifitas obat dapat ditingkatkan dengan mengubah profil farmakokinetika obat-obatan yang memiliki toksisitas tinggi dan bioavailabilitas rendah (Stela Santos-Magalhães and Carla Furtado Mosqueira, 2009). Penggunaan nanopartikel dilaporkan dapat mengatasi masalah resistensi akibat mutasi gen transporter CQ melalui jalur ambilan obat yang berbeda, antara lain melalui mekanisme fusi membran serta induksi instabilitas membran yang dipicu oleh perbedaan pH pada kompartemen sel (Wong *et al.*, 2006; Swaan, 2007). Selain itu, nanopartikel yang stabil dapat meningkatkan efektivitas obat terkait kontrol pelepasan obat dan waktu sirkulasi yang lebih lama di dalam darah. Oleh karena itu, selektifitas hantaran obat ke target dapat diperoleh tanpa mengakibatkan konsentrasi obat yang tinggi dan toksik terhadap sel tubuh yang sehat (Owens and Peppas, 2006). Di antara sekian banyak tipe nanopartikel, liposom menawarkan beberapa kelebihan, antara lain dapat dimodifikasi dengan beragam jenis lipid serta dapat

dikonjugasikan dengan berbagai jenis ligan, tergantung tujuan atau target terapi yang diinginkan (Allen and Cullis, 2013).

Liposom adalah bentukan vesikel yang terdiri atas dua lapisan fosfolipid yang melingkupi fase air sebagai bagian inti sehingga dapat memberikan perlindungan yang optimal terhadap bahan obat dari difusi oleh media luar (Kohli *et al.*, 2014). Dengan ukurannya yang kecil (<125 nm), liposom dapat terakumulasi secara efektif pada sel hepatosit. Hal ini dikarenakan adanya celah antar sel atau fenestrae yang berukuran 125-175 nm pada susunan sel endotelial di sinusoid hepar (Baratta *et al.*, 2009). Proses penjejakan obat yang efektif dan polietilen glikolasi (PEG-lasi) pada permukaan liposom dapat meminimalkan klirens obat dari tubuh serta menghasilkan obat dengan waktu sirkulasi panjang di dalam darah (Barenholz, 2012). Dengan demikian, obat dapat terakumulasi optimal di hepatosit. Selain itu, pelepasan CQ secara teratur selama sirkulasi sistemik juga bermanfaat untuk pencegahan ataupun pengobatan infeksi fase eritrositik.

Tujuan utama dari usulan penelitian ini adalah untuk mengembangkan terapi pengobatan yang efektif untuk penanganan infeksi malaria, terutama fase hepatic. Dengan menggunakan kombinasi PQ dan CQ yang dienkapsulasikan ke dalam liposom, diharapkan agar terapi ini mampu meningkatkan efikasi PQ serta menurunkan toksisitasnya melalui mekanisme hambatan metabolisme PQ oleh CQ. Selain itu, sebagai kombinasi obat, PQ akan efektif mencegah terjadinya infeksi akut oleh infeksi sporozoit maupun relaps malaria oleh fase laten hipnozoit di hepar, sementara kandungan CQ di liposom dapat berfungsi sebagai terapi profilaksis jika terjadi infeksi fase eritrositik. Pada infeksi fase hepatic, sporozoit yang masuk ke dalam tubuh secara spesifik hanya akan menyerang sel hepatosit daripada sel-sel non-parenkim lainnya di hepar. Dengan demikian, hantaran obat yang spesifik ditujukan untuk sel hepatosit akan bermanfaat untuk peningkatan efektifitas terapi serta penurunan toksisitas PQ dan CQ untuk terapi malaria.

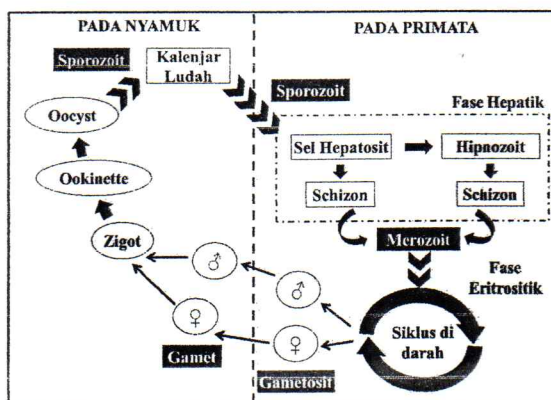
Penggunaan liposom telah dilaporkan sebagai sistem hantaran obat untuk PQ dan CQ pada terapi malaria (Stensrud *et al.*, 2000; Qiu, Jing and Jin, 2008; Stela Santos-Magalhães and Carla Furtado Mosqueira, 2009), namun belum ada penelitian sebelumnya tentang penggunaan liposom untuk kombinasi keduanya. Pada penelitian ini, PQ dan CQ dienkapsulasi sebagai kombinasi dalam liposom yang tersusun atas fosfolipid yang bermuatan netral dan menggunakan polietilen glikol yang dikonjugasikan dengan lipid bermuatan negatif pada permukaan luar liposom. Parameter kritis dalam proses pembuatan liposom serta karakterisasi liposom yang meliputi ukuran partikel, ζ -potensial, dan efisiensi penjejakan telah dievaluasi untuk menentukan kondisi optimal pembuatan serta stabilitas

liposom. Dibandingkan dengan obat tunggal, penjebakan obat ke dalam liposom sebagai kombinasi juga berpengaruh terhadap efisiensi penjebakannya serta pelepasan obat dari liposom.

BAB 2. STUDI PUSTAKA

2.1 Tinjauan mengenai penyakit malaria.

Infeksi malaria memiliki beberapa tahapan dimana melibatkan fase pembawa (nyamuk) dan *host*/penderita (manusia) sebagaimana dapat dilihat pada **gambar 1** (Cowman *et al.*, 2016). Ketika nyamuk *Anopheles* sp. betina yang terinfeksi malaria menggigit tubuh penderita, sporozoit yang terakumulasi pada kelenjar ludah nyamuk akan masuk ke dalam tubuh. Sporozoit ini selanjutnya akan benetrasi masuk melewati bagian dermis kulit, menuju ke sirkulasi darah, dan selanjutnya akan bermigrasi menuju liver dalam waktu yang sangat singkat. Sporozoit tersebut akan berkembang menjadi schizon dan hipnozoit, dimana schizon merupakan fase awal permulaan terjadinya infeksi fase eritrositik dan hipnozoit merupakan fase laten parasit yang akan menyebabkan terjadinya relaps malaria beberapa waktu kemudian. Setelah 7-16 hari, schizon akan pecah dan melepaskan merozoit ke dalam sirkulasi darah yang akan menginfeksi eritrosit membentuk trophozoit. Trophozoit ini akan membelah diri secara progresif sehingga mengakibatkan eritrosit pecah, menimbulkan gejala anemia dan panas pada penderita. Setelah 2-3 hari kemudian, siklus infeksi trophozoit ini akan terjadi berulang. Sebagian trophozoit akan berkembang menjadi bentuk aseksual gametosit, yang dapat diambil ulang oleh nyamuk saat menggigit penderita yang terinfeksi.

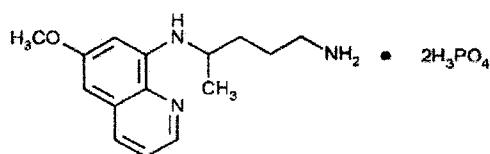


Gambar 2.1 Siklus hidup *Plasmodium* sp. pada manusia.

Pada beberapa kasus, relaps malaria dapat terjadi akibat reaktivasi fase dorman parasit, yaitu hipnozoit (Chu and White, 2016). Beberapa penderita yang telah dinyatakan sembuh dari infeksi malaria dapat mengalami penyakit yang sama tanpa melalui proses re-infeksi malaria dalam waktu 3 minggu sampai dengan 9 bulan terakhir setelah gigitan nyamuk.

2.2 Penggunaan PQ sebagai obat untuk terapi malaria.

PQ merupakan obat malaria yang termasuk ke dalam golongan 8-amino kuinolin (**gambar 2**) dan menjadi satu-satunya bahan obat yang memperoleh lisensi edar oleh *Food and Drug Administration* (FDA) untuk pengobatan relaps malaria yang diakibatkan oleh *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* (Longley *et al.*, 2016). Efikasi PQ sangat bergantung pada biotransformasinya di dalam tubuh (Marcsisin, Reichard and Pybus, 2016). Kombinasi yang unik pada struktur molekul PQ, yaitu gugus metoksi pada posisi 6- dan gugus amino pada posisi 8-, menghasilkan aktivitas anti-hipnozoit dari PQ. Aktivitas ini terkait dengan aktivasi PQ, utamanya melalui metabolisme di hepar.



Gambar 2.2 Struktur kimia primakuin bisfosfat (PQ).

PQ dilaporkan dapat berinteraksi dengan enzim monoamino oksidase (MAO) dan beberapa enzim sitokrom P450 di hepar. MAO lebih berperan pada katalisis tahap pertama, yakni deaminasi menjadi aldehida untuk menghasilkan karboksi-PQ sebagai metabolit utama PQ. Pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) melalui siklus redoks metabolit-metabolit yang terhidroksilasi lebih berperan terhadap efikasi dan efek toksik PQ, dimana hidroksilasi metabolit ini diperantarai oleh enzim sitokrom P450 2D6 (CYP 2D6) (Pybus *et al.*, 2013). Hidroksilasi PQ oleh CYP 2D6 akan menghasilkan metabolit-metabolit yang tidak stabil, salah satunya adalah 5-hidroksi-PQ (Marcsisin, Reichard and Pybus, 2016). Metabolit ini mampu menjembatani reaksi siklus redoks dan menghasilkan stres oksidatif, antara lain hidroksi peroksida dan radikal bebas (ROS). Stres oksidatif inilah yang bersifat toksik terhadap parasit dan menghasilkan aktivitas antimalaria dari PQ, sementara senyawa utuh PQ sendiri memiliki aktivitas anti-parasit yang lemah.

Pada penggunaan per oral, PQ dapat mencapai konsentrasi maksimum (C_{max}) pada 1-2 jam setelah pemberian obat, akan tetapi akan dimetabolisme secara cepat sehingga menyebabkan waktu paruh ($t_{1/2}$) obat yang sangat pendek, yaitu sekitar 1,5 jam pada mencit atau 4 jam pada manusia (Marcsisin, Reichard and Pybus, 2016). Telah dilaporkan bahwa penggunaan obat antimalaria lain yang mempengaruhi aktivitas enzim CYP 2D6 secara bersamaan akan dapat menyebabkan interaksi obat dan mengubah profil farmakokinetika PQ

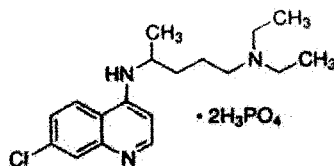
(Marcsisin, Reichard and Pybus, 2016). Obat-obatan tersebut antara lain CQ, kinin, kombinasi dihidroartemisinin-piperakuin, dan pironaridin-artesunat.

Pasien yang menderita defisiensi *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6PD) dan memiliki kapasitas perbaikan sel yang terbatas akibat stres oksidatif sangat terpengaruh terhadap efek samping PQ, yaitu hemolisis (Burgoine, Bancone and Nosten, 2010). Efek samping hemolisis akibat terapi PQ ditandai dengan gejala anemia berat, urin yang berwarna gelap pada kasus hemolisis intravaskular, dan penyakit kuning atau ikterus. Sebagian besar gejala tersebut bergantung pada dosis PQ serta seberapa besar defisiensi G6PD yang dialami. Selain mengakibatkan hemolisis, penggunaan PQ per oral dapat menyebabkan anoreksia, mual, muntah, dan kram perut. Efek ini kadang terjadi pada dosis harian yang lebih besar dari dosis normal (0,25 mg/kg berat badan, BB, PQ base), yaitu pada dosis 0,50 mg/kg BB (sekitar 30 mg/hari pada dewasa) (Jong and Nothdurft, 2001).

Secara umum, sebagai tindakan profilaksis, sebesar 30 mg PQ base diberikan per oral sekali sehari yang diberikan sehari sebelum perjalanan, dilanjutkan dengan pemberian setiap hari selama perjalanan sampai dengan 7 hari setelah kepulangan dari daerah endemik

2.3 Penggunaan CQ yang dikombinasikan dengan PQ pada terapi malaria.

CQ merupakan senyawa 4-aminoquinoline (**gambar 3**) yang bekerja melalui hambatan heme polimerase sehingga mencegah proses konversi heme, yaitu senyawa produk hasil samping digesti hemoglobin yang bersifat toksik, menjadi pigmen malaria yang bersifat non-toksik oleh parasit (World Health Organization, 2015). Oleh karena itu, CQ efektif untuk pengobatan infeksi fase eritrositik, namun tidak efektif untuk penanganan infeksi malaria fase hepatic. Seringkali ditemukan resistensi CQ pada kasus infeksi *Plasmodium falciparum* akibat mutasi pada gen transporter CQ (Ursing *et al.*, 2016). Penggunaan CQ dilaporkan dapat menyebabkan retinopati (Browning, 2014).



Gambar 2.3 Struktur kimia klorokuin difosfat (CQ).

Pemberian CQ pada dosis 10 mg/kg BB selama 3 hari berturut-turut pada terapi kombinasi dengan PQ dosis 0,25 mg/kg BB selama 14 hari memberikan hasil yang efektif untuk terapi gejala malaria sekaligus mencegah terjadinya relaps infeksi malaria yang

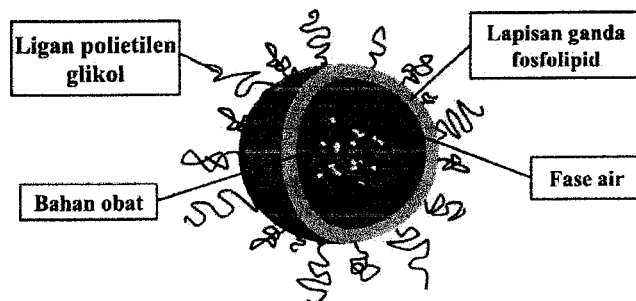
disebabkan oleh *Plasmodium vivax* (Gonzalez-Ceron *et al.*, 2015). Hasil penelitian oleh Pukrittayakamee *et al.* juga menunjukkan bahwa penggunaan CQ dosis 600 mg sebagai terapi kombinasi dengan PQ pada dosis 30 mg telah berhasil meningkatkan jumlah PQ utuh dan metabolit utama PQ, yakni karboksi-PQ, di dalam plasma dengan mempengaruhi proses metabolisme PQ oleh jalur selain yang melibatkan enzim MAO (Pukrittayakamee *et al.*, 2014). Hal ini menyebabkan efek peningkatan efikasi obat dan penurunan toksisitas PQ. Selain itu, juga Simooya *et al.* juga melaporkan bahwa penggunaan CQ pada dosis klinik memiliki efek hambatan terhadap aktivitas metabolisme oleh CYP 2D6 sehingga menimbulkan potensiasi efek PQ (Simooya *et al.*, 1998). Dalam penelitian yang lain (Fasinu *et al.*, 2016), penggunaan CQ dapat menghambat aktivitas hidroksilasi PQ oleh enzim CYP 2D6 secara signifikan sehingga menurunkan jumlah metabolit karboksi-PQ glukoronida dan PQ alkohol, namun tidak mempengaruhi deplesi PQ oleh MAO dan sel hepatosit. Hal ini menyebabkan jumlah metabolit PQ yang terdeaminasi primer, termasuk karboksi-PQ dan derivat siklik rantai samping aldehida, tidak banyak berkurang. Berdasarkan hal tersebut, penggunaan CQ dapat mempengaruhi jalur metabolisme PQ secara kompleks, dengan menurunkan pembentukan metabolit PQ yang toksik terhadap eritrosit tanpa mengurangi efikasinya.

2.4 Liposom sebagai pembawa obat pada terapi malaria.

Liposom (**gambar 4**) adalah bentukan vesikel yang tersusun atas senyawa fosfolipid dalam susunan lapisan ganda sebagai membran liposom yang melingkupi fase air sebagai bagian inti liposom (Çağdaş, Sezer and Bucak, 2014). Liposom mampu memberikan perlindungan stabilitas yang optimal untuk obat-obatan yang terenkapsulasi di dalamnya serta menjaganya dari pelepasan obat yang prematur melalui kontrol difusi air melewati membran liposom yang bersifat semipermeabel. Selain itu, liposom juga memiliki kemudahan untuk fungsionalisasi permukaan vesikel oleh ligan-ligan tertentu, misalnya dengan pembentukan lapisan polietilen glikol pada permukaan luar liposom (Barenholz, 2012). Dengan adanya lapisan polietilen glikol yang bersifat hidrofilik, maka identifikasi liposom sebagai partikel asing oleh sistem imun tubuh, antara lain sistem retikuloendotelial (RES) dan fagositosis mononuclear (MPS) di hepar dan limfa, dapat dicegah sehingga dapat menurunkan klirens liposom.

Telah diketahui bahwa susunan sel endotelial di hepar memiliki karakter yang khusus, dimana terdapat celah antar sel yang tersusun membentuk formasi seperti “lempeng saringan” (Baratta *et al.*, 2009). Hal ini dikarenakan keberadaan basal lamina yang jarang di bagian

dalam sel endotelial serta tidak adanya diafragma penutup celah tersebut. Sebagai akibatnya, molekul-molekul kecil (<125 nm) akan dapat berpenetrasi masuk dari celah Disse dan lumen kapiler ke dalam jaringan hepar. Dengan demikian, liposom dengan ukurannya yang kecil (nano) dapat terakumulasi di dalam jaringan hepar, sebagaimana yang terlihat pada fenomena efek peningkatan permeasi obat secara pasif pada jaringan kanker (Fang, Nakamura and Maeda, 2011), dan selanjutnya diambil oleh sel hepatosit melalui mekanisme endositosis. Akumulasi obat yang tinggi di dalam jaringan hepar akan memungkinkan untuk penurunan dosis obat namun tetap memberikan efikasi pengobatan yang baik.



Gambar 2.4 Ilustrasi bentukan vesikel liposom.

Dibandingkan dengan PQ bebas, PQ dalam liposom memiliki pola distribusi obat yang berbeda, dimana konsentrasi obat diperoleh lebih tinggi di organ target, yaitu liver, dan ambilan obat yang berkurang di organ lain. Akan tetapi, dibandingkan PQ bebas, efek obat yang dihasilkan tidak meningkat serta PQ liposom juga dieksresikan secara cepat melalui urin. Hal ini dikarenakan PQ liposom tersebut sebagian besar diambil oleh sel Kupffer, bukan oleh sel hepatosit (Stela Santos-Magalhães and Carla Furtado Mosqueira, 2009). Dengan menggunakan komposisi kolesterol yang lebih tinggi pada liposom, waktu paruh PQ dapat diperpanjang dan eliminasi melalui urin dapat dikurangi sebesar 8 kali. Sekitar 50% obat yang diinjeksi terakumulasi di liver dan ambilan obat di limfa meningkat sebanyak 3 kali, namun akumulasi obat di organ lain berkurang secara signifikan sehingga liposom dapat menurunkan toksisitas PQ.

Sementara itu, penggunaan liposom bermuatan negatif dengan penambahan *phosphatidylglycerol* atau *phosphatidylethanolamine* yang dikombinasikan dengan polietilen glikol menghasilkan enkapsulasi CQ yang tinggi serta waktu sirkulasi obat yang panjang di dalam tubuh (Qiu, Jing and Jin, 2008). CQ berhasil dienkapsulasi ke dalam liposom menggunakan gradien pH transmembran, dimana liposom yang dihasilkan memiliki ukuran partikel 90-110 nm dan 99% efisiensi pengebakan obat. CQ menunjukkan profil pelepasan yang berbeda pada jenis liposom yang berbeda. Pada liposom konvensional (tanpa poli

etilenglikol), sekitar 30% obat dilepaskan pada pH 7,4 selama 6 jam. Sementara, CQ dilepaskan <10% pada liposom yang menggunakan polietilen glikol yang dikonjugasikan dengan *phosphatidylethanolamine*.

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan khusus penelitian ini adalah:

1. Menentukan suhu dan waktu inkubasi yang optimal untuk pembuatan liposom PQ dan liposom CQ dengan karakteristik fisikokimia (ukuran vesikel, zeta potensial, dan efisiensi enkapsulasi) yang baik.
2. Menentukan rasio lipid:obat yang optimal untuk pembuatan liposom PQ dan liposom CQ.
3. Menentukan pengaruh rasio kombinasi PQ dan CQ terhadap ukuran partikel, PDI, zeta potensial dan efisiensi enkapsulasi obat ke dalam liposom
4. Menentukan profil pelepasan PQ dan CQ dari liposom kombinasi keduanya.

3.1.2 Tujuan umum penelitian ini adalah:

Untuk menghasilkan formulasi liposom untuk hantaran kombinasi obat CQ dan PQ yang memiliki ukuran partikel kecil (<150 nm), zeta potensial yang relatif netral (<-30 mV) dengan efisiensi enkapsulasi obat yang maksimal sehingga efektif untuk hantaran obat ke hepar guna penanganan malaria fase hepatic.

3.2 Manfaat Penelitian

Secara spesifik, penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai informasi untuk pengembangan formulasi kombinasi primakuin dan klorokuin terkait pemilihan waktu dan suhu inkubasi liposom dan pemilihan rasio obat:lipid terhadap pembuatan sistem liposom sebagai terapi pada penyakit malaria fase hepatic.

Dengan menggunakan sistem penghantaran obat menggunakan liposom serta penggunaan kombinasi obat PQ dan CQ diharapkan agar tingkat efektifitas terapi meningkat melalui peningkatan jumlah fraksi obat aktif di dalam tubuh serta mengurangi toksisitasnya. Selain itu, penelitian ini merupakan awal pengembangan terapi yang ditujukan untuk fase hepatic dengan terapi ganda CQ sebagai profilaksis terbentuknya infeksi fase eritrositik. Dengan demikian, hasil yang diperoleh nantinya dapat dikembangkan lebih lanjut untuk pengembangan terapi malaria yang efektif dan komprehensif.



BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah primakuin bifosfat (Sigma-Aldrich, Rehovot, Israel), klorokuin difosfat (Sigma-Aldrich, Gyeonggi-do, South Korea), fosfolipid *Hydrogenated Soy Phosphatidylcholine* (HSPC) (Nor Corporation, Tokyo, Jepang), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycerol)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀) (Nof Corporation, Jepang), kolesterol (Wako Inc, Wako, Jepang), bufer sitrat pH 5,0, KH₂PO₄ (*pro analisis*) (Merck, Darmstadt, Jerman), Na₂HPO₄ (*pro analisis*) (Merck, Darmstadt, Jerman), Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Jerman), kloroform (*pro analisis*) (Merck, Darmstadt, Jerman), metanol (*pro analisis*) (Merck, Darmstadt, Jerman). Jika tidak disebutkan lain, reagen dan bahan yang dipakai memiliki grade non-teknis.

4.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Rotary Evaporator* (Buchi Rotavapor R-3, Flawil, Switzerland), *Extruder* (Avanti®, Alabama, USA), *Waterbath Ultrasonic* (Sonica Ultrasonic Cleaner, Milan, Itali), *Vortex Mixer* (Clever scientific, Warwickshire, United Kingdom), Spektrofotometer FT-IR (Shimadzu, Kyoto, Jepang), Delsa™ Nano C *Particle Analyzer* (Beckman Coulter®, Indianapolis, United States), Spektrofotometer Uv-Vis (Shimadzu, Kyoto, Jepang), *Stirring Hotplate* (Thermo Scientific, Indonesia) dan alat-alat gelas..

4.3. Identifikasi kualitatif bahan

4.3.1 Pemeriksaan Organoleptis.

Uji organoleptis dilakukan terhadap bahan yang digunakan dalam penelitian, antara lain primakuin dan klorokuin dengan cara pemeriksaan visual meliputi bentuk, warna dan rasa. Hasil yang diperoleh selanjutnya dibandingkan dengan pustaka.

4.3.2 Pemeriksaan spektra inframerah (IR) dengan menggunakan teknik pellet KBr.

Uji kualitatif dengan FTIR dilakukan terhadap bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu primakuin dan klorokuin. Sebanyak 1 mg sampel dengan 100 mg KBr digerus sampai homogen, kemudian dalam pengering hampa udara, selanjutnya dicetak dengan penekan hidrolik sampai diperoleh lempeng tipis yang tembus cahaya. Diperiksa pada

bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} . Spektra inframerah sampel dibandingkan dengan spektra inframerah dari pustaka.

4.4. Pembuatan liposom dan evaluasi efisiensi penjemputan obat.

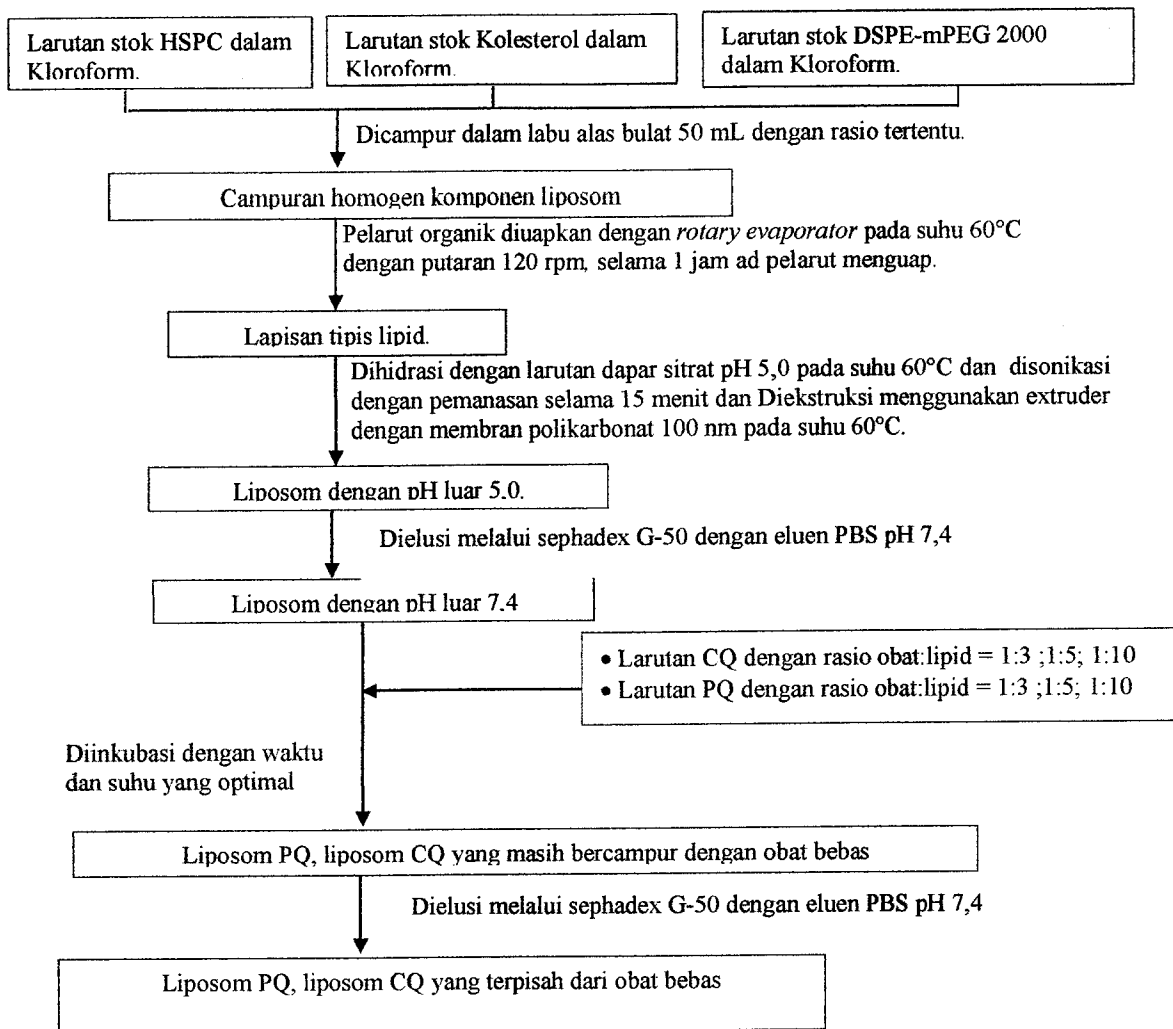
Liposom akan dibuat dengan menggunakan fosfolipid, kolesterol, dan 1,2 *distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-methoxy-polyethylene glycol* (DSPE-mPEG, berat molekul rerata PEG: 2,000) sebagai komponen penyusun dasar pada rasio tertentu sebagaimana tertera pada Tabel IV.1. Selanjutnya, proses pembuatan liposom dilakukan dengan menggunakan metode lapisan tipis lipid, sebagaimana tertera pada Gambar 4.1. Untuk menghasilkan vesikel unilamellar dengan ukuran partikel sekitar 100 nm, liposom tersebut diekstrusi melalui mini-ekstruder dengan blok pemanas (Avanti Polar Lipids, Inc.) dengan menggunakan membran polikarbonat yang memiliki ukuran pori 100 nm sebanyak 30 kali siklus.

Tabel IV.1 Formula liposom untuk optimasi waktu dan suhu inkubasi

Bahan	Fungsi	Jumlah
HSPC	Fosfolipid	11,8 mg
DSPE-mPEG ₂₀₀₀	Lipid	3,88 mg
Kolesterol	Membran <i>Stabilizer</i>	4,26 mg
Klorokuin	Bahan aktif	2,56 mg

Keterangan:

- Rasio lipid:kolesterol:DSPE-mPEG₂₀₀₀ = 55:40:5 (rasio %molar)
- Larutan hidrasi menggunakan dapar sitrat pH 5,0 sebanyak 1 mL
- Larutan untuk *loading* obat menggunakan dapat fosfat salin pH 7,4
- Formula tersebut akan diinkubasi pada dua suhu yang berbeda dengan tiga waktu inkubasi yang berbeda, yaitu:
 - Suhu 50°C dengan waktu 10 menit, 20 menit, dan 30 menit.
 - Suhu 60°C dengan waktu 10 menit, 20 menit, dan 30 menit.



Gambar 4.1 Skema pembuatan liposom

Untuk memasukkan obat ke dalam fase interior liposom, fase luar liposom diganti dengan meluasi liposom melewati kolom gel Sephadex G-50 dengan menggunakan PBS pH 7,4. Kemudian larutan obat dan liposom dicampur pada rasio berat PQ dan CQ tertentu, sebagaimana tertera pada tabel IV.2, untuk memperoleh kadar maksimal PQ dan CQ di dalam liposom. Campuran obat dan liposom tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit.

Tabel IV.2 Formula liposom untuk optimasi rasio lipid:obat CQ

Bahan	Fungsi	Formula		
		C1L3/ P1L3	C1L5/ P1L5	C1L10/ P1L10
HSPC	Fosfolipid	11,8 mg	11,8 mg	11,8 mg
DSPE-mPEG ₂₀₀₀	Lipid	3,88 mg	3,88 mg	3,88 mg
Kolesterol	Membran <i>Stabilizer</i>	4,26 mg	4,26 mg	4,26 mg
Bahan obat: PQ/CQ	Bahan Aktif	6,67 mg	4 mg	2 mg

Keterangan:

- a) P1L3 : rasio PQ: lipid = 1:3 (massa)
C1L3 : rasio CQ: lipid = 1:3 (massa)
- b) P1L5 : rasio PQ: lipid = 1:5 (massa)
C1L5 : rasio CQ: lipid = 1:5 (massa)
- c) P1L10 : rasio PQ: lipid = 1:10 (massa)
C1L10 : rasio CQ: lipid = 1:10 (massa)

Selanjutnya, liposom kombinasi PQ dan CQ dengan formula sebagaimana tertera pada Tabel IV.3. Suspensi liposom dan larutan bahan obat diinkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit.

Tabel IV.3 Formula liposom kombinasi PQ dan CQ.

Bahan	Fungsi	Formula				
		P1C0	P0C1	P1C1	P1C3	P1C5
Primakuin	Bahan Aktif	1 mg	-	1,66 mg	0,83 mg	0,55 mg
Klorokuin	Bahan Aktif	-	3,33 mg	1,66 mg	2,48 mg	2,78 mg
HSPC	Fosfolipid	5,94 mg	5,94 mg	5,94 mg	5,94 mg	5,94 mg
DSPE- PEG2000	Polimer	1,94 mg	1,94 mg	1,94 mg	1,94 mg	1,94 mg
Kolesterol	Membran <i>Stabilizer</i>	2,13 mg	2,13 mg	2,13 mg	2,13 mg	2,13 mg

Keterangan:

- Formula P1C0 : rasio PQ-lipid (1:10)
Formula P0C1 : rasio CQ-lipid (1:3)
Formula P1C1 : rasio PQ-CQ-lipid (0,5:0,5:3)
Formula P1C3 : rasio PQ-CQ-lipid (0,25:0,75:3)
Formula P1C5 : rasio PQ-CQ-lipid (0,125:0,875:3)

Fraksi obat bebas kemudian dipisahkan dari fraksi liposom melalui proses eluasi liposom melewati kolom gel Sephadex G50 dengan menggunakan PBS pH 7,4. Konsentrasi obat yang terjebak di dalam liposom dianalisis dan kadar obat diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV, yaitu pada λ : 282 nm untuk PQ dan λ : 330 nm untuk CQ. Efisiensi penjebakan obat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai jumlah obat yang terjebak dalam liposom dibagi jumlah total obat keseluruhan.

$$\text{Efisiensi penjebakan obat (\%)} = \frac{\text{jumlah obat pada fraksi liposom}}{\text{total jumlah obat (bebas + liposom)}} \times 100\%$$

4.5. Evaluasi pengukuran ukuran partikel, zeta potensial, dan stabilitas liposom.

Rerata ukuran partikel dan ζ -potensial liposom diukur dengan menggunakan metode kumulatif dan mobilitas elektroforetik dengan menggunakan fotometer hamburan sinar pada suhu 25°C setelah sampel diencerkan dengan aquades pada tingkat pengenceran tertentu. Stabilitas sediaan dievaluasi dengan mengamati perubahan fisik sediaan, ukuran partikel, potensial zeta (ζ), serta persen enkapsulasi obat selama penyimpanan.

4.6. Studi pelepasan obat *in vitro*.

Uji pelepasan obat dilakukan dengan memasukkan sejumlah volume sampel liposom ke dalam membran dialisis Spectra Por[®]7 dengan *molecular weight cut-off* (MWCO) 3.500. Membran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam media 50 mL buffer fosfat-saline (PBS) pH 7,4 dengan pengadukan terus menerus di dalam pemanas air suhu 37°C. Kemudian pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-0,5; 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 dengan cara mengambil 2 ml sampel dari media dan menggantinya dengan sejumlah volume yang sama PBS pH 7,4 suhu 37°C. Untuk analisis kadar obat dari uji pelepasan dilakukan koreksi Wurster.

4.7. Penetapan Kadar PQ dan CQ.

4.7.1 Penetapan kadar PQ dan CQ tunggal

Dibuat larutan baku PQ kadar 2000 ppm. Kemudian larutan baku induk diencerkan dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4 untuk membuat larutan baku kerja dengan kadar 20,60, 90, 150, 200, 300 ppm. Dan untuk uji pelepasan larutan dibuat baku kerja dengan kadar 2, 4, 8, 12, 18 ppm. Larutan baku kerja 20,60, 90, 150, 200, 300 ppm dan 2, 4, 8, 12, 18 ppm diukur pada panjang gelombang maksimum yaitu 282 nm. Data yang diperoleh

dibuat grafik serapan vs kadar dengan persamaan garis $y = ax + b$ (kadar sebagai absis dan serapan sebagai ordinat).

Dibuat larutan baku CQ 1000 ppm. Larutan baku induk kemudian diencerkan dengan PBS pH 7,4 untuk membuat larutan baku kerja dengan kadar 5,10, 15, 20, 25, 30 ppm. Dan untuk uji pelepasan dibuat larutan baku kerja dengan kadar 1, 2, 4, 6, 8 ppm. Larutan baku kerja 5,10, 15, 20, 25, 30 ppm dan 1, 2, 4, 6, 8 ppm diukur pada panjang gelombang maksimum yaitu 330nm (Qiu *et al.*, 2008). Data yang diperoleh dibuat grafik serapan vs kadar dengan persamaan garis $y = ax + b$ (kadar sebagai absis dan serapan sebagai ordinat).

Untuk penetapan kadar obat bebas, sampel langsung diukur dengan metode tersebut di atas. Sedangkan untuk penetapan kadar obat dalam liposom, prosedur di atas ditambahkan metanol dengan perbandingan 1:1 (v/v), begitu pula untuk sampel yang ditambahkan.

4.7.2 Penetapan kadar PQ dan CQ kombinasi

Analisis campuran PQ dan CQ dilakukan dengan metode spektrofotometer UV derivatif order $1\Delta\lambda$ (N) 1 sebagaimana yang telah diteliti Annuryanti *et al* (data belum dipublikasikan). Dibuat larutan baku PQ dan CQ dengan kadar 1000 ppm. Larutan baku induk kemudian diencerkan dengan PBS pH 7,4 untuk membuat larutan baku kerja PQ kadar 10 ppm, CQ kadar 30 ppm dan PQ+CQ (1:3) dengan kadar PQ sebesar 1,4, 6, 8, 10 ppm dan CQ sebesar 3,12, 18, 24, 30 ppm.

Kemudian larutan baku kerja PQ 10 ppm, CQ 30 ppm, dan larutan baku kerja PQ+CQ (1:3) dengan kadar PQ sebesar 1,4, 6, 8, 10 ppm dan CQ sebesar 3,12, 18, 24, 30 ppm diukur pada $\lambda = 280$ dan 346 nm. Data yang diperoleh dibuat grafik $\Delta A/\Delta\lambda$ vs kadar dengan persamaan garis $y = ax + b$ (kadar sebagai absis dan $\Delta A/\Delta\lambda$ sebagai ordinat).

Untuk penetapan kadar obat bebas, sampel langsung diukur dengan metode tersebut di atas. Sedangkan untuk penetapan kadar obat dalam liposom, prosedur di atas ditambahkan metanol dengan perbandingan 1:1 (v/v), begitu pula untuk sampel yang ditambahkan.

4.8. Analisis data.

Data yang diperoleh merupakan nilai rata-rata dari 3 replikasi. Data tersebut kemudian dianalisis menggunakan statistika dengan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) one way dilanjutkan dengan uji HSD (*Honestly Significant Difference*) untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna antar formula. Apabila harga $p < 0,05$, maka dinyatakan terdapat perbedaan bermakna antar nilai data.

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Identifikasi Kualitatif PQ

Hasil identifikasi kualitatif PQ meliputi pemeriksaan secara organoleptis dan pemeriksaan spektra FTIR, masing-masing dapat dilihat Tabel V.1 dan Tabel V.2. Adapun profil spektra menggunakan spektrofotometer FTIR dapat dilihat pada Lampiran 1.

Tabel V.1 Hasil uji organoleptis PQ.

No	Pemeriksaan	Hasil Pemeriksaan	Data literatur*)
1.	Organoleptis	Bentuk	Serbuk
		Warna	Jingga
		Bau	Tidak Berbau

*) (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2014)

Tabel V.2 Spektrum FTIR PQ.

Gugus	Hasil Pemeriksaan bilangan gelombang (cm^{-1})	Data literatur bilangan gelombang (cm^{-1}) ^{*)}
NH ₂	2945	3530
C-N	1612	1649
P-O	899, 1049	988, 1058

*) (Balaji, 2017)

Dari hasil pemeriksaan secara kualitatif dapat diketahui bahwa PQ yang digunakan dalam penelitian ini memiliki identitas yang sesuai dengan tercantum dalam literatur.

5.2 Identifikasi Kualitatif CQ

Hasil identifikasi kualitatif CQ meliputi pemeriksaan secara organoleptis dan pemeriksaan spektra FTIR, masing-masing dapat dilihat Tabel V.3 dan Tabel V.4. untuk hasil uji menggunakan spektrofotometer FTIR dapat dilihat pada Lampiran 1.

Tabel V.3 Hasil uji organoleptis CQ

No	Pemeriksaan	Hasil Pemeriksaan	Data literatur ^{*)}
1.	Organoleptis	Bentuk	Serbuk
		Warna	Putih
		Bau	Tidak Berbau

*) (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2014)

Tabel V.4 Spektrum FTIR CQ

Gugus	Hasil Pemeriksaan bilangan gelombang (cm^{-1})	Data literatur bilangan gelombang (cm^{-1}) ^{*)}
NH	3411	3427
CH Arimatik	3236	3230
C-N	1552	1558
P-O	1093,942	1061,1000

*) (Balaji, 2017)

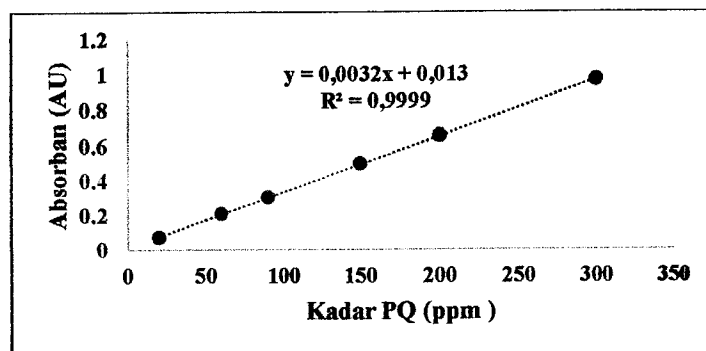
Dari hasil pemeriksaan secara kualitatif dapat diketahui bahwa CQ yang digunakan dalam penelitian ini memiliki identitas yang sesuai dengan tercantum dalam literatur.

5.3 Kurva Baku PQ dan CQ untuk penetapan kadar obat bebas.

Hasil plotting kurva baku kadar primakuin dengan absorban untuk menentukan kadar primakuin bebas dapat dilihat pada Tabel V.5. dan gambar grafiknya tersaji pada Gambar 5.1.

Tabel V.5 Kurva baku PQ dengan menggunakan metode spektrofotometri pada λ :282 nm.

Kadar PQ (ppm)	Nilai Absorban (AU)
20	0,072
60	0,207
90	0,303
150	0,497
200	0,657
300	0,971

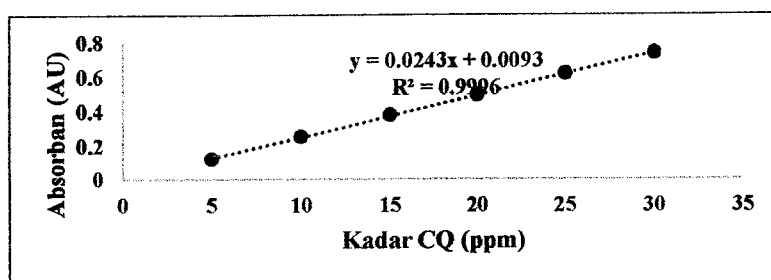
**Gambar 5.1** Grafik linearitas kurva baku PQ yang diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri pada λ =282 nm

Berdasarkan hasil pengukuran kadar PQ didapatkan persamaan regresi linier kurva baku hubungan antara kadar ($\mu\text{g/mL}$) dengan absorban, yaitu $y = 0,0032x + 0,013$, dengan korelasi linearitas $R^2 = 0,9999$.

Selanjutnya, dilakukan pengukuran kadar CQ dan hasil pengukuran kurva baku kadar klorokuin dengan absorban untuk menentukan kadar klorokuin bebas dapat dilihat pada Tabel V.6. dan gambar grafiknya tersaji pada Gambar 5.2.

Tabel V.6 Kurva baku klorokuin dengan menggunakan metode spektrofotometri UV pada $\lambda = 330 \text{ nm}$.

Kadar CQ (ppm)	Nilai Absorban (AU)
5	0,125
10	0,256
15	0,380
20	0,494
25	0,618
30	0,736



Gambar 5. 2 Kurva baku klorokuin dengan menggunakan metode Spektrofotometri UV pada $\lambda: 330 \text{ nm}$.

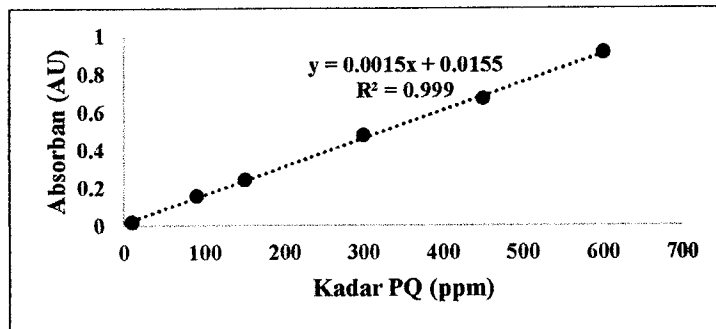
Hasil pengukuran kadar klorokuin didapatkan persamaan regresi linier kurva baku hubungan antara kadar ($\mu\text{g/mL}$) dengan absorban, yaitu $y = 0,0243x + 0,0093$ dengan korelasi linearitas $R^2 = 0,9996$.

5.4 Kurva baku PQ dan CQ untuk penetapan kadar obat dalam liposom (dengan penambahan metanol).

Hasil pengukuran kurva baku kadar primakuin dan absorban yang dibuat dengan penambahan metanol untuk pengukuran kadar primakuin dalam liposom dapat dilihat pada Tabel V.7. dan gambar grafiknya ditunjukkan pada Gambar 5.3.

Tabel V.7 Kurva baku PQ yang dibuat dengan penambahan metanol menggunakan metode spektrofotometri UV pada $\lambda=282$ nm.

Kadar PQ (ppm)	Nilai Absorban (AU)
10	0,019
90	0,156
150	0,243
300	0,477
450	0,674
600	0,913



Gambar 5.3 Kurva baku PQ yang dibuat dengan penambahan metanol menggunakan metode spektrofotometri UV pada :282 nm.

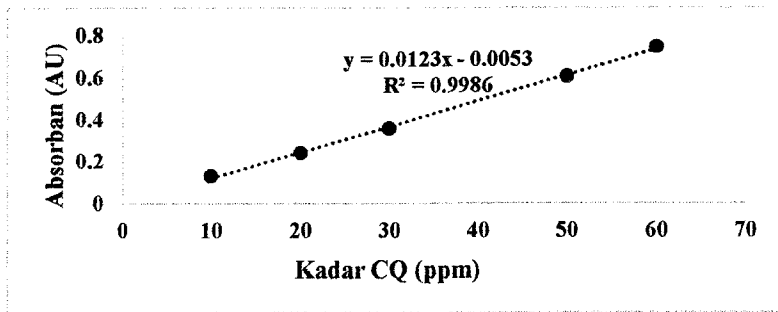
Hasil pengukuran kadar PQ didapatkan persamaan regresi linier kurva baku hubungan antara kadar ($\mu\text{g/mL}$) dengan absorban yang dibuat dengan penambahan metanol, yaitu $y=0,0015x + 0,0155$ dengan $R^2 = 0,999$.

Kemudian hasil pengukuran kurva baku kadar CQ dan absorban untuk pengukuran kadar PQ dalam liposom dapat dilihat pada Tabel V.8. dan gambar grafiknya ditunjukkan pada Gambar 5.4.

Tabel V.8 Kurva baku CQ yang dibuat dengan penambahan metanol menggunakan metode *spectrofotometri uv-vis* dengan $\lambda:330$ nm.

Tabel 0.9

Kadar CQ (ppm)	Nilai Absorban (AU)
10	0,128
20	0,237
30	0,356
50	0,603
60	0,745

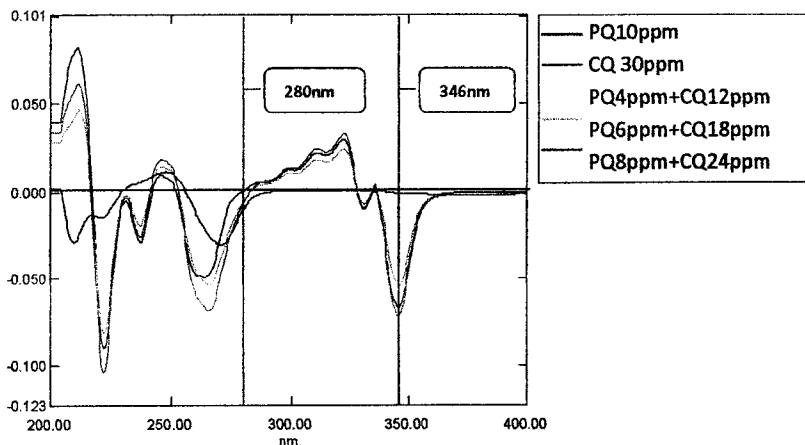


Gambar 5.4 Kurva baku CQ yang dibuat dengan penambahan metanol menggunakan metode spektrofotometri UV dengan λ : 330 nm.

Hasil pengukuran kadar CQ didapatkan persamaan regresi linier kurva baku hubungan antara kadar ($\mu\text{g/mL}$) dengan absorban yang dibuat dengan penambahan metanol, yaitu $y=0,0123x-0,0053$ dengan korelasi linearitas $R^2 = 0,9986$.

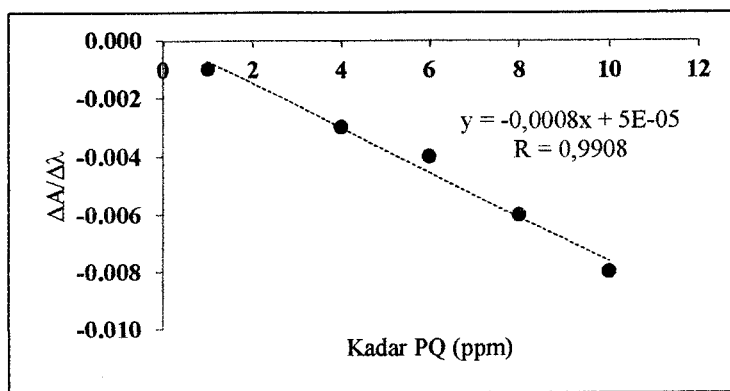
5.5 Penetapan kadar untuk kombinasi PQ dan CQ.

Telah dilakukan pengukuran PQ kadar 10 ppm dan CQ kadar 30 ppm dan campuran PQ+CQ dengan menggunakan metode spektrofotometri UV derivatif order 1 $\Delta\lambda$ (N) 1 pada λ : 280 nm dan 346nm. Pada λ : 280 nm, PQ kadar 10 ppm memberikan serapan yang tinggi, sedangkan CQ kadar 30 ppm tidak memberikan serapan. Kemudian pada λ : 346, CQ kadar 30ppm memberikan serapan yang tinggi, sedangkan PQ kadar 10 ppm tidak memberikan serapan (Gambar 5.3). Jadi metode ini dapat digunakan untuk analisis campuran PQ dan CQ.



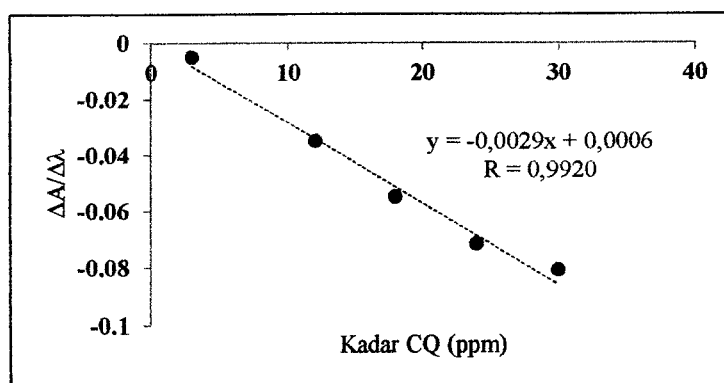
Gambar 5.5 Profil spektra derivatif order 1 $\Delta\lambda$ (N) 1 PQ dan CQ pada berbagai kadar.

Pada pembuatan kurva baku campuran PQ dan CQ dengan alat spektrofotometer metode derivatif order 1 pada λ : 280 dan 346 nm, didapatkan persamaan kurva baku dengan nilai $y = -0,0008x + 0,00005$ dengan $r = 0,9908$ untuk PQ (Gambar 5.6).



Gambar 5.6 Kurva baku kombinasi PQ dan CQ dalam PBS pH 7,4 yang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis derivatif order 1 $\Delta\lambda$ (N) 1 pada λ : 280nm.

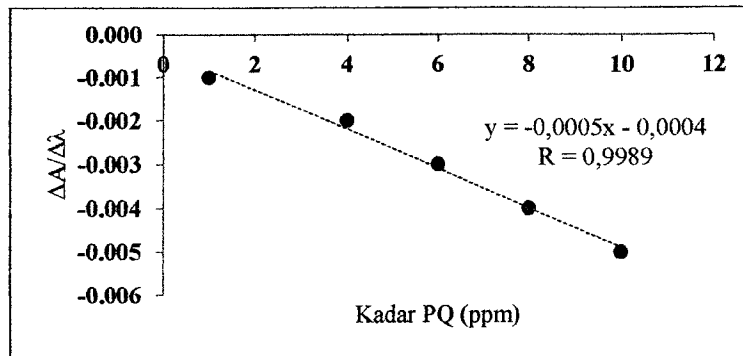
Kemudian untuk kurva baku CQ dihasilkan persamaan regresi linier $y = -0,0029x + 0,0006$ dengan $r = 0,9920$ (Gambar 5.7).



Gambar 5.7 Kurva baku kombinasi PQ dan CQ dalam PBS pH 7,4 yang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV derivatif order 1 $\Delta\lambda$ (N) 1 pada λ : 346nm.

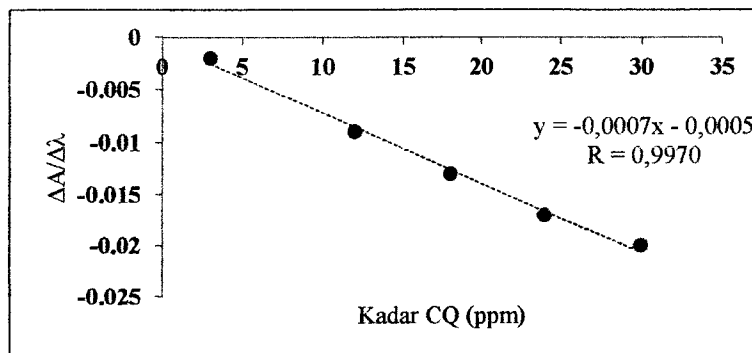
Pada pembuatan kurva baku campuran PQ dan CQ untuk penetapan kadar obat yang terjebak dalam liposom larutan baku kerja primakuin dan klorokuin ditambah metanol dengan rasio 1:1 (v/v). Larutan baku kerja diukur dengan alat spektrofotometer metode derivatif order 1 pada λ : 280 dan 346nm didapatkan persamaan regresi dengan nilai $y = -0,0005x - 0,0004$ dengan nilai r sebesar $= 0,9989$ (Gambar 5.8).

Adapun hasil ukuran partikel, nilai PDI, nilai zeta potensial dari liposom CQ dan liposom PQ untuk penentuan rasio obat:lipid dapat dilihat dalam Tabel V.10.



Gambar 5.8 Kurva baku kombinasi PQ dan CQ dalam PBS pH 7,4 dengan penambahan metanol yang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis derivatif order 1 $\Delta\lambda$ (N) 1 pada $\lambda = 280\text{nm}$.

Kemudian untuk penetapan kadar CQ, dihasilkan persamaan regresi linier $y = -0,0007x - 0,0005$ dengan nilai r sebesar $= 0,9970$ (Gambar 5.9).



Gambar 5.9 Kurva baku kombinasi primakuin dan klorokuin dalam pH 7,4 dengan penambahan methanol yang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV derivatif order 1 $\Delta\lambda$ (N) 1 pada $\lambda: 346\text{nm}$.

5.6 Ukuran partikel dan zeta potensial liposom

Hasil penentuan ukuran partikel, PDI, zeta potensial liposom CQ pada penentuan waktu dan suhu inkubasi dapat dilihat pada Tabel V.9. Hasil analisis statistika dari ukuran partikel dan nilai PDI liposom untuk optimasi suhu dan waktu inkubasi dengan menggunakan *two way anova* didapatkan jika $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan jika tidak ada perbedaan yang bermakna. Sedangkan, hasil analisis statistik dari nilai zeta potensial dengan metode *two way anova* antar variabel waktu didapatkan jika $p > 0,05$ yang berarti menunjukkan jika tidak ada perbedaan signifikan. Sedangkan hasil statistik antara variabel suhu didapatkan jika $p < 0,05$, yang menunjukkan adanya perbedaan signifikan.

Tabel V.9 Ukuran partikel, nilai PDI, nilai zeta potensial liposom CQ dengan rasio massa obat:lipid 1:5.

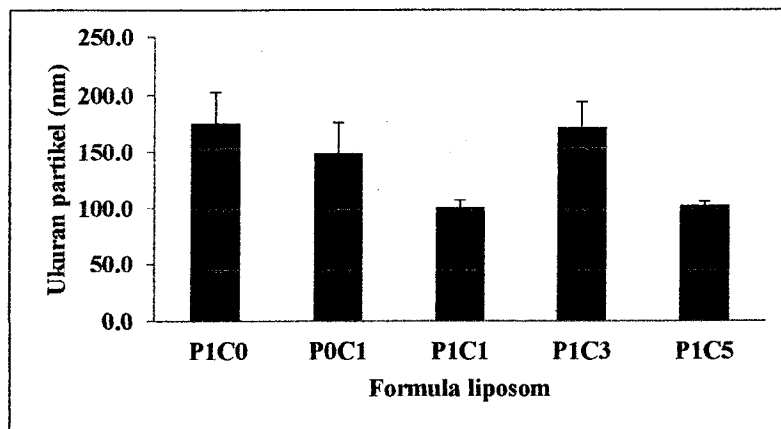
Kondisi inkubasi	Ukuran Partikel (nm)			Rata – rata±SD (nm)	PDI			Rata – rata±SD	ζ Potensial (mV)			Rata – rata±SD (mV)	
	Suhu	Waktu	Rep I		Rep II	Rep III	Rep I		Rep II	Rep III	Rep I		Rep II
60°C	10 menit	137,0	133,3	98,3	122,9±21,4	0,274	0,359	0,291	0,308±0,04	-13,32	-20,68	-16,77	-16,92±3,68
	20 menit	141,4	125,5	103,2	123,4±19,2	0,246	0,297	0,407	0,317±0,08	-10,43	-25,49	-34,55	-3,49±12,18
	30 menit	157,5	159,3	105,6	140,8±30,5	0,140	0,337	0,316	0,264±0,11	-14,95	-24,83	-19,48	-19,75±4,95
50°C	10 menit	126,3	126,0	113,7	121,0±6,5	0,382	0,280	0,243	0,302±0,07	-9,92	-16,63	-7,38	-11,31±4,78
	20 menit	130,5	115,5	123,3	123,1±7,5	0,230	0,438	0,391	0,353±0,11	-4,64	-4,37	-7,91	-5,64±1,97
	30 menit	109,6	137,1	132,0	126,2±14,63	0,215	0,303	0,290	0,269±0,05	-16,19	-4,26	-12,29	-10,91±6,08

Tabel V.10 Ukuran partikel, nilai PDI, nilai zeta potensial liposom CQ dan liposom PQ yang dibuat dengan inkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit.

Bahan Obat	Formul a	Ukuran Partikel (nm)			Rata – rata±S D (nm)	PDI			Rata – rata±SD	Zeta Potensial (mV)			Rata –rata±SD (mV)
		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III		Rep I	Rep II	Rep III	
CQ	C1L3	156,9	171,7	118,6	149,1± 27,40	0,188	0,220	0,218	0,209±0,02	-17,84	-28,42	-21,85	-22,70±5,34
		141,1	125,5	103,2	123,4± 19,19	0,246	0,297	0,407	0,317±0,08	-10,43	-25,49	-34,55	-23,49±12,18
		158,9	172,7	127,7	153,1± 23,05	0,100	0,174	0,175	0,150±0,04	-25,85	-27,58	-13,13	-22,19±7,89
PQ	P1L3	172,4	204,4	150,6	175,8± 27,06	0,885	0,409	0,258	0,517±0,33	-11,37	-17,27	-21,67	-16,77±5,17
		135,7	154,0	196,7	162,1± 31,30	0,498	0,848	0,360	0,569±0,25	-14,31	-19,59	-25,02	-19,64±5,36
		127,4	208,6	155,5	163,8± 41,24	0,354	0,286	0,375	0,338±0,05	-22,18	-16,31	-14,83	-17,77±3,89

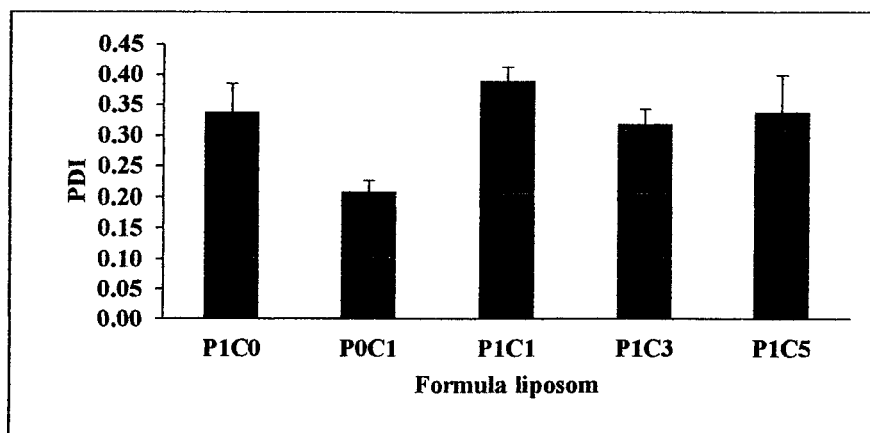
Hasil statistika ukuran partikel masing-masing liposom, yaitu liposom CQ yang dianalisis menggunakan metode *one way anova* menyatakan jika $p < 0,05$ yang berarti ada perbedaan yang signifikan antara liposom C1L5 dan C1L10. Sedangkan untuk liposom PQ hasil yang didapatkan jika $p > 0,05$ yang menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna. Hasil statistika PDI dan ζ -potensial masing-masing liposom yaitu liposom CQ dan liposom PQ yang dianalisis menggunakan metode *one way anova* menyatakan jika $p > 0,05$ yang berarti tidak ada perbedaan yang signifikan.

Selanjutnya dilakukan pembuatan liposom kombinasi PQ dan CQ. Hasil penentuan ukuran partikel, PDI dan zeta potensial liposom CQ rasio obat : lipid (1:3), liposom PQ rasio obat : lipid (1:10) dan liposom kombinasi PQ dan CQ dapat dilihat pada Tabel V.11, V.12, dan V.13.



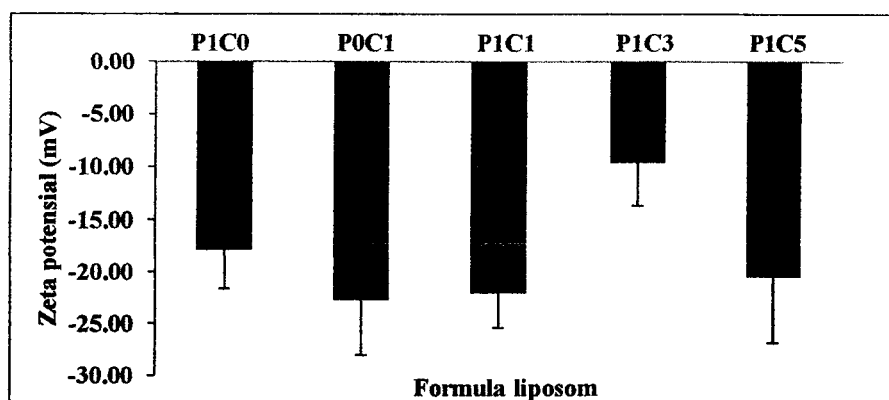
Gambar 5.10 Histogram nilai rata-rata ukuran partikel liposom PQ tunggal (P1C0), liposom CQ tunggal (P0C1) dan liposom kombinasi PQ+CQ (P1C1, P1C3, dan P1C5) pada $T = 25^{\circ}\text{C}$ ($n=3$).

Hasil pemeriksaan ukuran partikel dianalisis menggunakan ANOVA one way didapatkan $p < 0,05$ yang menunjukkan ada perbedaan bermakna antar formula liposom. Untuk mengetahui formula yang berbeda, maka dilakukan uji HSD. Hasil uji HSD menunjukkan ada perbedaan bermakna antara formula P1C1 dan P1C5 dengan formula P1C0, yaitu $P1C1 = P1C5 < P1C0$.



Gambar 5.11 Histogram nilai rata-rata PDI liposom PQ tunggal (P1C0), liposom CQ tunggal (P0C1) dan liposom kombinasi PQ+CQ (P1C1, P1C3, dan P1C5) pada $T = 25^{\circ}\text{C}$ ($n=3$).

Hasil pemeriksaan PDI dianalisis menggunakan ANOVA one way didapatkan $p < 0,05$ yang menunjukkan ada perbedaan bermakna antar formula liposom. Untuk mengetahui formula yang berbeda, maka dilakukan uji HSD. Hasil uji HSD menunjukkan ada perbedaan bermakna antara formula P0C1 dengan formula P1C0, P1C1, P1C3, P1C5, yaitu $P0C1 < P1C0 = P1C1 = P1C3 = P1C5$.



Gambar 5.12 Histogram nilai rerata zeta potensial liposom PQ tunggal (P1C0), liposom CQ tunggal (P0C1) dan liposom kombinasi PQ+CQ (P1C1, P1C3, dan P1C5) pada $T = 25^{\circ}\text{C}$ ($n=3$).

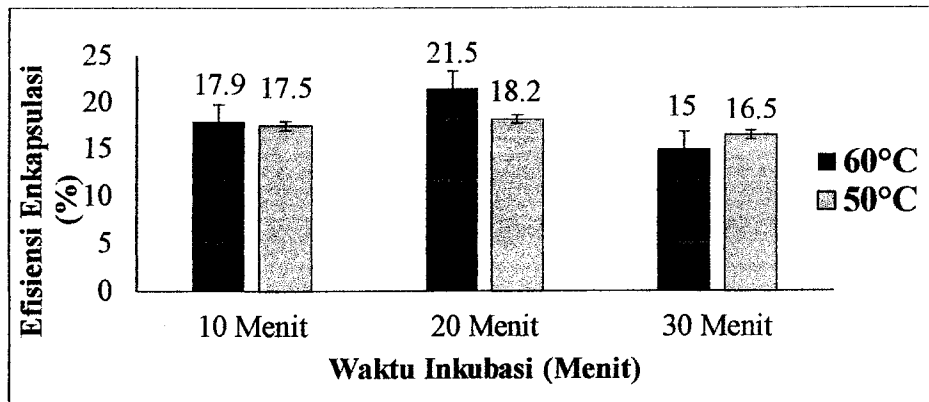
Hasil pemeriksaan zeta potensial dianalisis menggunakan annova one way didapatkan $p < 0,05$ yang menunjukkan ada perbedaan bermakna antar formula liposom. Untuk mengetahui formula yang berbeda, maka dilakukan uji HSD. Hasil uji HSD menunjukkan ada perbedaan bermakna antara formula P0C1 dengan formula P1C3 yaitu $P0C1 < P1C3$.

5.7 Efisiensi enkapsulasi liposom.

Hasil penentuan efisiensi enkapsulasi liposom klorokuin pada penentuan waktu dan suhu inkubasi dapat dilihat pada Tabel V.11 dan Gambar 5.5 untuk suhu inkubasi 60°C dan suhu inkubasi 50°C.

Tabel V.11 Efisiensi enkapsulasi (%) liposom CQ yang dibuat pada rasio massa obat:lipid 1:5 pada suhu dan waktu inkubasi yang berbeda.

No	Liposom		Efisiensi Enkapsulasi (%)			Rata-rata ±SD (%)
	Suhu	Waktu	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	
1.	60°C	10 menit	18,0%	21,0%	14,7%	17,9% ± 3,2%
		20 menit	21,1%	26,3%	17,2%	21,5% ± 4,6%
		30 menit	15,6%	12,9%	16,5%	15,0% ± 1,9%
2.	50°C	10 menit	19,8%	17,0%	15,6%	17,5% ± 2,1%
		20 menit	20,5%	18,1%	16,1%	18,2% ± 2,2%
		30 menit	19,7%	15,6%	14,3%	16,5% ± 2,8%



Gambar 5.13 Efisiensi enkapsulasi (%) liposom CQ yang dibuat pada rasio massa obat:lipid 1:5 pada suhu dan waktu inkubasi yang berbeda (n=3).

Berdasarkan data diatas, semakin meningkatnya suhu maka rata-rata efisiensi enkapsulasi relatif akan semakin tinggi, namun hal tersebut terjadi pada waktu optimal yaitu 20 menit, namun tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).

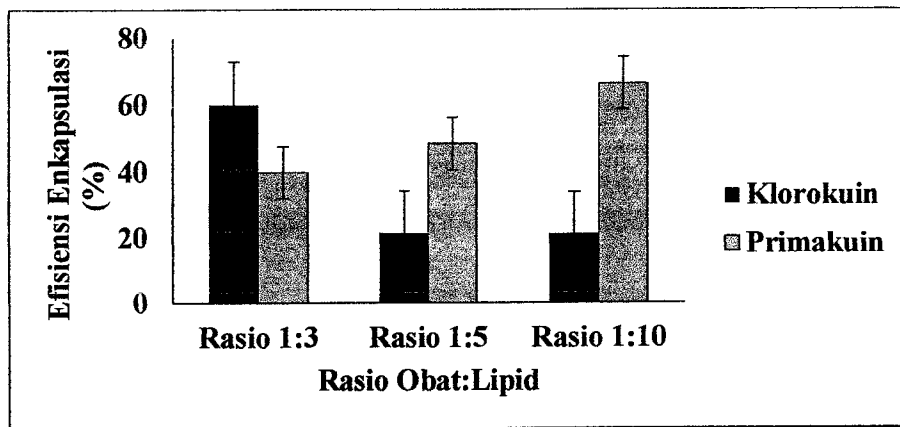
Hasil efisiensi enkapsulasi liposom CQ dan liposom PQ pada penentuan rasio obat yang berbeda berturut-turut dapat dilihat pada Tabel V.12 dan Tabel V.13. Tersaji juga Gambar 5.14 untuk efisiensi enkapsulasi liposom CQ dan liposom PQ.

Tabel V.12 Efisiensi enkapsulasi (%) liposom PQ yang diinkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit (n=3).

Liposom		% Efisiensi Enkapsulasi			Rata –rata± SD
Bahan Obat	Formula	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	
PQ	P1L3	36,2%	41,4%	42,4%	40,0% ± 3,3%
	P1L5	44,9%	50,9%	49,7%	48,5% ± 3,1%
	P1L10	58,1%	66,8%	74,5%	66,4% ± 8,2%

Tabel V.0.13 Efisiensi enkapsulasi (%) liposomCQ yang diinkubasi pada suhu 60°C selama 20 menit (n=3).

Liposom		% Efisiensi Enkapsulasi			Rata –rata± SD
Bahan Obat	Formula	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	
CQ	C1L3	52,7%	59,1%	68,4%	60,1% ± 7,9%
	C1L5	21,1%	26,3%	17,2%	21,5% ± 4,6%
	C1L10	16,7%	15,3%	31,9%	21,3% ± 9,2%

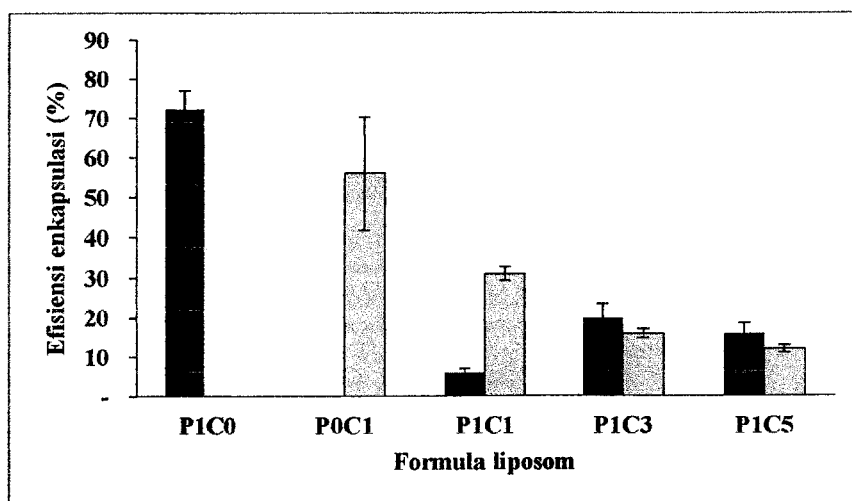
**Gambar 5.14** Efisiensi enkapsulasi (%) liposom CQ dan liposom PQ pada suhu 60°C dengan waktu 20 menit (n=3).

Data di atas menunjukkan bahwa rata-rata efisiensi enkapsulasi liposom CQ akan semakin menurun seiring dengan semakin kecil rasio obat:lipid, yaitu dengan efisiensi enkapsulasi paling tinggi pada formula dengan rasio obat:lipid 1:3. Sedangkan untuk formulasi liposom PQ, rata-rata efisiensi enkapsulasi akan semakin meningkat apabila rasio obat:lipid semakin besar, dengan efisiensi paling tinggi yaitu pada formulasi dengan rasio obat:lipid 1:10.

Hasil penentuan efisiensi enkapsulasi liposom CQ tunggal rasio obat:lipid (1:3), liposom PQ tunggal rasio obat : lipid (1:10), dan liposom kombinasi PQ dan CQ dapat dilihat pada Tabel V.14 dan Gambar 5.15.

Tabel V.14 Efisiensi enkapsulasi (%) liposom PQ tunggal (P1C0), liposom CQ tunggal (P0C1) dan liposom kombinasi PQ+CQ (P1C1, P1C3, dan P1C5) yang dianalisis dengan menggunakan metode spektrofotometri UV.

Formula Liposom	EE PQ (%)			Rata-rata±SD	EE CQ (%)			Rata-rata±SD
	I	II	III		I	II	III	
P1C0	76	67	74	72 ± 4,73	-	-	-	-
P0C1	-	-	-	-	40	59	68	56 ± 15
P1C1	7	6	5	6 ± 1	33	30	30	31 ± 2
P1C3	23	16	20	20 ± 4	17	15	17	16 ± 1
P1C5	14	19	16	16 ± 3	12	13	11	12 ± 1



Gambar 5.15 Histogram nilai EE rata-rata liposom PQ tunggal (P1C0), liposom CQ tunggal (P0C1) dan liposom kombinasi PQ+CQ (P1C1, P1C3, dan P1C5) (n=3).

Hasil efisiensi enkapsulasi dianalisis menggunakan ANOVA one way didapatkan $p < 0,05$ yang menunjukkan ada perbedaan bermakna antar formula liposom. Untuk mengetahui formula yang berbeda, maka dilakukan uji HSD. Hasil uji HSD menunjukkan ada perbedaan bermakna antara formula P1C0 dengan formula P0C1, P1C1, P1C3, P1C5 yaitu $P1C0 > P1C0 = P1C1 = P1C3 = P1C5$.

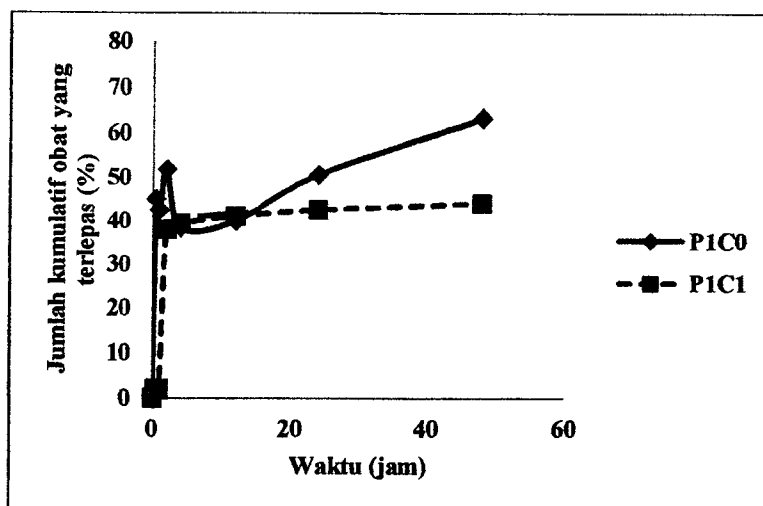
5.8 Hasil pelepasan primakuin dan klorokuin dari sistem liposom

Kemudian dilakukan uji pelepasan primakuin dan klorokuin dari sistem liposom dengan menggunakan membran dialisis dengan media PBS pH 7,4 dengan suhu 37°C. Pengambilan sampel dilakukan pada 30 menit 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 jam sebanyak 2mL dan pada setiap pengambilan dilakukan penggantian dengan larutan PBS pH 7,4 dengan jumlah

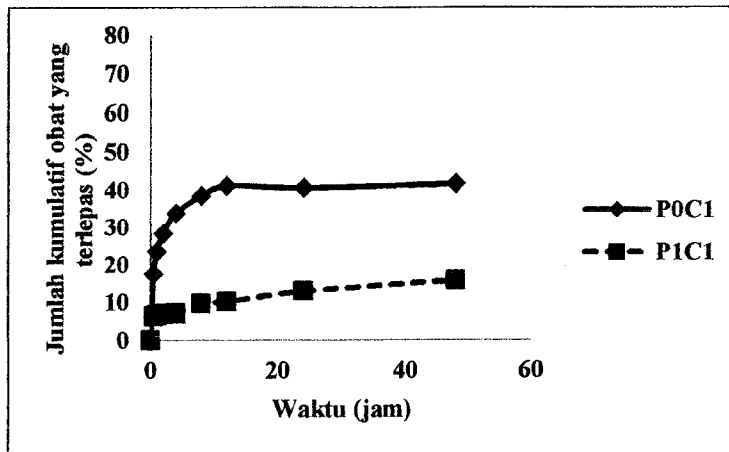
yang sama. Hasil uji pelepasan PQ dan CQ dari sistem liposom dapat dilihat pada Tabel V.15, gambar 5.16 dan gambar 5.17.

Tabel V.15 Jumlah kumulatif PQ dan CQ yang terlepas dari sediaan liposom dengan menggunakan metode dialisis menggunakan media PBS pH 7,4 pada suhu 37°C.

Waktu (jam)	Jumlah kumulatif obat yang terlepas (%)			
	P1C0	P0C1	P1C1	
			PQ	CQ
0.5	42,52	34.06	1.80	11.11
1	40,18	32.74	1.87	11.56
2	48,98	39.36	37.84	12.00
4	36,29	35.47	39.35	12.44
8	52,26	41.42	4.95	17.16
12	37,73	43.53	40.93	17.78
24	47,78	38.97	42.44	22.67
48	59,81	48.91	43.95	27.73



Gambar 5.16 Profil pelepasan PQ dari liposom PQ tunggal (P1C0) dan liposom kombinasi PQ dan CQ (P1C1) menggunakan media PBS pH 7,4 pada suhu 37°C.



Gambar 5.17 Profil pelepasan CQ dari liposom CQ tunggal (P0C1) dan liposom kombinasi PQ dan CQ (P1C1) menggunakan media PBS pH 7,4 pada suhu 37°C.

Dari data tersebut dapat dilihat bahwa jumlah kumulatif obat terlepas (%) pada jam ke-48 untuk formula P1C0 sebesar 41.69%, sedangkan untuk formula P0C1 adalah sebesar 48.91%. Sedangkan untuk liposom kombinasi formula P1C1 sebesar 43.95% untuk PQ dan 27.73% untuk CQ. Profil pelepasan liposom kombinasi menunjukkan pelepasan yang relatif lebih lambat dibandingkan dengan liposom tunggal.

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

6.1 Karakterisasi termodinamika liposom kombinasi PQ dan CQ menggunakan analisis kalorimetri.

Pengamatan *differential thermogram analysis* (DTA) sampel dilakukan dengan menggunakan buffer fosfat pH 7,4 pada konsentrasi lipid 2 mg/mL. Laju pemanasan diatur pada kondisi tertentu untuk mengetahui rentang suhu yang tepat untuk masing-masing fosfolipid. Termogram kemudian diukur selama pemanasan setelah ekuilibrium sampel uji pada temperatur awal. Seluruh pengukuran dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

6.2 Evaluasi biodistribusi obat pada mencit.

Biodistribusi obat dievaluasi dengan menginjeksikan sejumlah liposom setara dengan 1,8 mg/kg PQ secara intravena melalui ekor mencit Balb/c. Pada waktu 24 jam setelahnya, plasma dan organ diambil. Kadar PQ dan CQ dalam plasma darah atau jaringan organ diukur dengan menggunakan metode *high performance liquid chromatography* (HPLC) (Singh and Vingkar, 2008).

6.3 Pembuatan liposom yang dikonjugasikan dengan ligan target

Sediaan liposom terpilih yang telah dihasilkan pada tahun I akan dikonjugasikan lebih lanjut dengan ligan target, misalnya: β -sitosterol, untuk hantaran spesifik obat ke liver. β -sitosterol diketahui memiliki aktivitas peningkatan penetrasi obat ke sel hepatosit. Optimasi rasio molar yang tepat untuk β -sitosterol pada liposom kombinasi obat PQ-CQ serta kondisi pembuatan menjadi titik evaluasi yang penting.

6.4 Evaluasi ambilan liposom kombinasi PQ dan CQ oleh sel hepatosit.

Pada tahapan berikutnya, evaluasi ambilan obat oleh sel hepatosit diamati dengan mengukur jumlah obat yang terdistribusi ke hepar dengan atau tanpa deplesi makrofag yang dapat dilakukan dengan penggunaan obat-obat golongan bisfosfonat, antara lain asam zoledronat. Hal ini dilakukan sebagai upaya untuk mengetahui seberapa besar ambilan obat di hepar yang spesifik oleh sel hepatosit serta melihat pengaruh ligan target terhadap ambilan liposom oleh makrofag di hepar (sel Kuppfer).

6.5 Evaluasi profil farmakokinetika dan distribusi obat

Pada tahap ini, akan dilakukan pengukuran profil farmakokinetika obat secara *in vivo* dengan mengukur kadar obat dalam darah dan jaringan pada beberapa waktu sampling. Hal ini dilakukan sebagai upaya untuk mengetahui profil distribusi dan ekskresi obat yaitu PQ dan CQ dari dalam tubuh.

6.6 Evaluasi aktivitas antimalaria fase eritrositik dari liposom kombinasi PQ-CQ

Setelah memperoleh data profil farmakokinetika obat di dalam darah, maka akan dilakukan evaluasi aktivitas antimalaria fase eritrositik dari CQ yang terenkapsulasi dalam kombinasi dengan PQ di dalam liposom. Evaluasi dilakukan dengan menggunakan model mencit yang terinfeksi parasit dengan jadwal pemberian obat sebagai tindakan profilaksis. Hal ini untuk mengetahui apakah sediaan yang dihasilkan memiliki efek pencegahan terhadap proses terjadinya infeksi fase eritrositik. Adapun aktivitas antimalaria fase hepatic dari sediaan liposom ini belum dapat direncanakan untuk dievaluasi dikarenakan keterbatasan fasilitas penelitian yang ada di UNAIR dan di Indonesia.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Suhu dan waktu inkubasi optimal adalah pada suhu 60° C dengan waktu 20 menit.
2. Rasio obat:lipid pada liposom CQ yang paling optimal adalah 1:3 karena adanya peningkatan rasio obat:lipid menyebabkan peningkatan efisiensi enkapsulasi.
3. Rasio obat:lipid pada liposom PQ yang paling optimal adalah 1:10 karena adanya penurunan rasio obat:lipid menyebabkan peningkatan efisiensi enkapsulasi.
4. Liposom kombinasi PQ dan CQ memiliki karakteristik fisikokimia liposom: ukuran partikel, PDI, dan zeta potensial yang relatif sama. Namun, efisiensi enkapsulasi liposom kombinasi tersebut lebih rendah dibandingkan dengan liposom obat tunggal.
5. Profil pelepasan liposom kombinasi PQ dan CQ memiliki tren pelepasan obat lebih lambat dibandingkan liposom PQ tunggal maupun liposom CQ tunggal.

7.2 Saran.

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai profil distribusi obat dan aktivitas antimalarial liposom yang telah dikembangkan.





DAFTAR PUSTAKA

- Allen, T. M. and Cullis, P. R. (2013) 'Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 65(1), pp. 36–48. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
- Balaji, J. (2017) 'Spectroscopic Investigation and Qualitative Analysis on Some Anti-Malarial Drugs Primaquine Phosphate and Chloroquine Phosphate', *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, V, pp. 1348–1354.
- Baratta, J. L. *et al.* (2009) 'Cellular organization of normal mouse liver: A histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis', *Histochem Cell Bio*, 131(6), pp. 713–726. doi: 10.1007/s00418-009-0577-1.Cellular.
- Barenholz, Y. (2012) 'Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned', *Journal of Controlled Release*. J Control Release, 160(2), pp. 117–134. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- Browning, D. J. (2014) 'Pharmacology of chloroquine and hydroxychloroquine', in Browning, D. J. (ed.) *Hydroxychloroquine and Chloroquine Retinopathy*. Springer New York, pp. 35–63. doi: 10.1007/978-1-4939-0597-3.
- Burgoine, K. L., Bancone, G. and Nosten, F. (2010) 'The reality of using primaquine.', *Malaria journal*, 9, p. 376. doi: 10.1186/1475-2875-9-376.
- Çağdaş, M., Sezer, A. D. and Bucak, S. (2014) 'Liposomes as potential drug carrier systems for drug delivery', in *Nanotechnology and Nanomaterials » 'Application of Nanotechnology in Drug Delivery'*, pp. 1–50. doi: 10.5772/57028.
- Chu, C. S. and White, N. J. (2016) 'Management of relapsing Plasmodium vivax malaria.', *Expert review of anti-infective therapy*. Taylor & Francis, 14(10), pp. 885–900. doi: 10.1080/14787210.2016.1220304.
- Cowman, A. F. *et al.* (2016) 'Malaria: Biology and Disease', *Cell*. Elsevier Inc., 167(3), pp. 610–624. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2014) *Farmakope Indonesia Edisi V*. Jakarta, Indonesia.
- Fang, J., Nakamura, H. and Maeda, H. (2011) 'The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 63(3), pp. 136–151. doi:

10.1016/j.addr.2010.04.009.

- Fasinu, P. S. *et al.* (2016) 'Pathway-specific inhibition of primaquine metabolism by chloroquine/quinine', *Malaria Journal*. BioMed Central, 15(1), p. 466. doi: 10.1186/s12936-016-1509-x.
- Gonzalez-Ceron, L. *et al.* (2015) 'Effectiveness of combined chloroquine and primaquine treatment in 14 days versus intermittent single dose regimen, in an open, non-randomized, clinical trial, to eliminate *Plasmodium vivax* in southern Mexico.', *Malaria journal*. BioMed Central, 14(1), p. 426. doi: 10.1186/s12936-015-0938-2.
- Jong, E. C. and Nothdurft, H. D. (2001) 'Current drugs for antimalarial chemoprophylaxis: a review of efficacy and safety.', *J. Trav. Med.*, 8(Suppl 3), pp. 48–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12186676>.
- Karyana, M. *et al.* (2016) 'Treatment-seeking behaviour and associated costs for malaria in Papua, Indonesia', *Malaria Journal*. BioMed Central, 15(1), p. 536. doi: 10.1186/s12936-016-1588-8.
- Kedar, P. *et al.* (2014) 'Primaquine-induced severe methemoglobinemia developed during treatment of *Plasmodium vivax* malarial infection in an Indian family associated with a novel mutation (p.Agr57Trp) in the CYB5R3 gene', *Clinica Chimica Acta*, 437, pp. 103–105. doi: 10.1016/j.cca.2014.07.015.
- Kohli, A. G. *et al.* (2014) 'Designer lipids for drug delivery: From heads to tails', *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 190, pp. 274–287. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.047.
- Longley, R. J. *et al.* (2016) 'High Efficacy of Primaquine Treatment for *Plasmodium vivax* in Western Thailand', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(5), pp. 1086–1089. doi: 10.4269/ajtmh.16-0410.
- Marcisin, S. R., Reichard, G. and Pybus, B. S. (2016) 'Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art', *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier B.V., 161, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.011.
- Mishra, M. *et al.* (2017) 'Comprehensive review on various strategies for antimalarial drug discovery', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 125, pp. 1300–1320. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.11.025.
- Owens, D. E. and Peppas, N. A. (2006) 'Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles', *International Journal of Pharmaceutics*, 307, pp. 93–102. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.
- Prudêncio, M., Rodriguez, A. and Mota, M. M. (2006) 'The silent path to thousands of

- merozoites: the Plasmodium liver stage.', *Nature reviews. Microbiology*, 4(11), pp. 849–56. doi: 10.1038/nrmicro1529.
- Pukrittayakamee, S. *et al.* (2014) 'Pharmacokinetic interactions between primaquine and chloroquine', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(6), pp. 3354–3359. doi: 10.1128/AAC.02794-13.
- Pybus, B. S. *et al.* (2013) 'The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6.', *Malaria journal*. *Malaria Journal*, 12(1), p. 212. doi: 10.1186/1475-2875-12-212.
- Qiu, L., Jing, N. and Jin, Y. (2008) 'Preparation and in vitro evaluation of liposomal chloroquine diphosphate loaded by a transmembrane pH-gradient method', *International Journal of Pharmaceutics*, 361(1–2), pp. 56–63. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.05.010.
- Recht, J. *et al.* (2015) *Safety of 8-Aminoquinoline antimalarial medicines*, WHO Geneva. Edited by E. Heseltine. WHO Press. doi: P3V183R1 [pii].
- Simooya, O. O. *et al.* (1998) 'Halofantrine and chloroquine inhibit CYP2D6 activity in healthy Zambians', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 45(3), pp. 315–317. doi: 10.1046/j.1365-2125.1998.00671.x.
- Singh, K. K. and Vingkar, S. K. (2008) 'Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine', *International Journal of Pharmaceutics*, 347(1–2), pp. 136–143. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.06.035.
- Stela Santos-Magalhães, N. and Carla Furtado Mosqueira, V. (2009) 'Nanotechnology applied to the treatment of malaria ☆', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, pp. 560–575. doi: 10.1016/j.addr.2009.11.024.
- Stensrud, G. *et al.* (2000) 'Formulation and characterisation of primaquine loaded liposomes prepared by a pH gradient using experimental design', *International Journal of Pharmaceutics*, 198(2), pp. 213–228. doi: 10.1016/S0378-5173(00)00338-0.
- Swaan, L. M. B. and P. W. (2007) 'Endocytic mechanisms for targeted drug delivery', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(8), pp. 748–758. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013) 'CDC in Indonesia Factsheet', *Centers for Disease Control and Prevention*, (CDC), pp. 1–2. Available at: <http://www.cdc.gov/globalhealth/countries/indonesia/pdf/indonesia.pdf>
<http://www.cdc.gov/globalhealth/countries/indonesia/pdf/indonesia.pdf>.

- Ursing, J. *et al.* (2016) 'High-Dose Chloroquine for Treatment of Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria', *Journal of Infectious Diseases*, 213(8), pp. 1315–1321. doi: 10.1093/infdis/jiv590.
- Wong, H. L. *et al.* (2006) 'A Mechanistic Study of Enhanced Doxorubicin Uptake and Retention in Multidrug Resistant Breast Cancer Cells Using a Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticle System', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), pp. 1372–1381. doi: 10.1124/jpet.106.101154.drug.
- World Health Organization (2015) *Guidelines for the treatment of malaria*. Third Edit, *Guidelines For The Treatment of Malaria*. Third Edit. Geneva: WHO Press. doi: 10.1016/0035-9203(91)90261-V.

LAMPIRAN 1

Draft Artikel Ilmiah



Dual drug loading of primaquine and chloroquine into liposome

Journal:	<i>Journal of Liposome Research</i>
Manuscript ID	LLPR-2018-0093
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	15-Nov-2018
Complete List of Authors:	Miatmoko, Andang; Universitas Airlangga Fakultas Farmasi, Department of Pharmaceutics; Faculty of Pharmacy, Airlangga University Salim, Ricky; Universitas Airlangga Fakultas Farmasi, Department of Pharmaceutics Zahro, Siti; Universitas Airlangga Fakultas Farmasi, Department of Pharmaceutics Hendradi, Esti; Universitas Airlangga Fakultas Farmasi, Department of Pharmaceutics
Keywords:	dual loading, primaquine, chloroquine, liposome

SCHOLARONE™
Manuscripts



URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/llpr> Email: Y.Perrie@aston.ac.uk

Journal of Liposome Research

1

Dual drug loading of primaquine and chloroquine into liposome

3

Andang Miatmoko^{a*}, Ricky Hartono Salim^a, Siti Maria Zahro^a, Esti Hendradi^a

5

^a Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Jl. Dharmawangsa

Dalam Selatan, Kampus B UNAIR, Surabaya, Jawa Timur 60286, Indonesia

8

9

* To whom correspondence should be addressed:

10

E-mail address: andang-m@ff.unair.ac.id

11

Tel/fax: +62-31-5033-710/+62-31-5020-514

12

Abstract

It has been known that primaquine (PQ) is still the only drug that is effective for therapy of hepatic stage malaria. However, severe toxicity limits its therapeutical use. Combining primaquine with chloroquine (CQ) has been reported to improve PQ's efficacy as well as reduce its toxicity. In this study, we determined the optimal condition for encapsulating PQ-CQ into liposome, which were incubation time and temperature, and also drug to lipid ratio. Futhermore, we evaluated the effect of loading combination of those two drugs on liposomal characteristics and drug released from liposome. Liposome was composed of HSPC, cholesterol, and DSPE-mPEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 55:40:5 and the drugs loaded by using transmembrane pH gradient method. The particle size, ζ -potential, and drug encapsulation efficiency were then evaluated. The results showed that all liposome were produced in similar particle size and ζ -potential. PQ and CQ could be optimally loaded into liposome by incubating the mixtures at 60°C for 20 minutes at drug to lipid ratio of 1:10 and 1:3 for PQ and CQ, respectively. Combining PQ and CQ into liposome resulted in lower drug encapsulation efficiency than those of single drug-loaded liposome. Futhermore, the amount of drug released from liposome were decreased in liposome containing combination of PQ and CQ. In conclusion, dual loading of PQ and CQ into liposome affected drug encapsulation and reduced the amount of drug released from liposome.

Keywords: dual loading, primaquine, chloroquine, liposome, release.

34 1. Introduction

35 In the world, malaria ranks fourth as the most deadly infectious disease (Mishra *et al.*, 2017).
36 Moreover, it has been reported that around 40 thousand people were death due to malaria
37 infection per year in Indonesia ((The Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013).
38 Malaria is caused by a parasitic infection of the genus *Plasmodium* sp., which is transmitted
39 through the bite of the infected female *Anopheles* mosquito. When mosquitoes suck blood, the
40 sporozoites that are accumulated in the salivary gland will enter bloodstream through the skin
41 penetration. Shortly after that, these sporozoites will go to the liver causing hepatic phase
42 infection. This stage is very important because it is the starting point for the development of
43 erythrocytic-stage malaria and deathly cerebral malaria (Prudêncio, Rodriguez and Mota, 2006).
44 In addition, the latent phase of hypnozoites, which is often happened in *Plasmodium ovale* and
45 *Plasmodium vivax* infection, can cause malaria relapses in about 50-80% of former sufferers
46 (Chu and White, 2016).

47 Primaquine (PQ) has been known as the main therapy for the hepatic phase malaria (Longley *et*
48 *al.*, 2016). PQ is an antimalarial pro-drug compound that belongs to the 8-aminoquinolin group.
49 It works actively against sporozoites, hypnozoites, asexual phases, and gametocytes through
50 inhibition of metabolic activity of mitochondrial parasites and the production of reactive
51 metabolites which are toxic to cells (Chu and White, 2016; Marcsisin, Reichard and Pybus,
52 2016). PQ is a drug with a short half-life, which is rapidly metabolized in the liver into a
53 carboxylic acid derivative that is highly excreted through urine. For infection treatment and
54 prevention of malaria relapse, PQ must be administered for 14 days (Karyana *et al.*, 2016).
55 However, although PQ has good efficacy for hepatic phase malaria, PQ can cause
56 methemoglobinemia and hemolysis in patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)

57 deficiency (Kedar *et al.*, 2014; Recht *et al.*, 2015; Marcsisin, Reichard and Pybus, 2016). In
58 addition, long duration of drug therapy can also cause abdominal cramps, nausea, and vomiting
59 (Jong and Nothdurft, 2001). These side effects decrease patient's adherences resulted in low PQ
60 levels in the blood. It has been reported that lowdoselevel in high parasitemiacases can cause
61 drug resistance, which becomes big problem in control program of malaria disease (Gonzalez-
62 Ceron *et al.*, 2015).

63 It has been previously reported that the use of PQ combined with chloroquine (CQ) provide an
64 effective way to treat malaria. CQ is a 4-aminoquinoline compound that is often used for
65 erythrocytic stage of malaria (World Health Organization, 2015). The combination of CQ
66 administration for three consecutive days and PQ for 14 days was able to treat erythrocytic phase
67 malaria infection and prevent the relapse of malaria infection effectively (Gonzalez-Ceron *et al.*,
68 2015; World Health Organization, 2015). In addition, the combination use of PQ and CQ
69 produce reduction in PQ toxicity without decreasing its efficacy against parasites (Fasinu *et al.*,
70 2016). This study informed that CQ can inhibit PQ metabolism by CYP2D6 thus reducing the
71 formation of active metabolites, which are toxic to erythrocytes.

72 The rational drug use is very important for malaria therapy, which regimens of therapeutic
73 doses are very closely related to malarial drug resistance. Considering that drug development for
74 malaria is still limited, expansion on finding more effective and non-toxic drug therapies is
75 absolutely necessary. The use of nanoparticulate carriers has provided new breakthroughs for
76 malaria therapy, which the efficacy of drug can be improved by changing the pharmacokinetic
77 profile, especially for drugs that have high toxicity and low bioavailability (Stela Santos-
78 Magalhães and Carla Furtado Mosqueira, 2009). It has been that nanoparticles could overcome
79 drug resistance due to mutation of the drug transporter gene that produce different uptake

80 pathways, including membrane fusion mechanisms and induction of membrane instability
81 triggered by pH difference in cell compartments (Wong *et al.*, 2006; Swaan, 2007). In addition,
82 stable nanoparticles can increase the drug efficacy that is related to control of drug release and
83 long circulating in the blood. Therefore, the drug could be highly delivered to the target without
84 causing high drug level in blood, which is toxic to healthy cells (Owens and Peppas, 2006).
85 Among the many types of nanoparticles, liposome offers great advantages, including
86 modification with various types of lipids and can be conjugated with various types of ligands, to
87 achieve effective therapeutic targets (Allen and Cullis, 2013).

88 Liposome is vesicular formation which consists of phospholipid bilayer surrounding inner
89 water phase thus providing optimal protection for drug againsts diffusion and external factors
90 (Kohli *et al.*, 2014). Due to its small size, liposome can highly accumulate in hepar tissue. It is
91 because of the presence of intercellular gap or fenestrae with size of 125-175 nm within
92 endothelial cells in the liver sinusoid (Baratta *et al.*, 2009). Moreover, PEGylation of liposome
93 can minimize drug clearance from the body and produce long drug circulation in the systemic
94 blood (Barenholz, 2012). Therefore, drug can be accumulated largely in hepatocytes. In addition,
95 slow CQ release during drug circulation in the blood is also useful for the prevention of
96 erythrocytic phase infections.

97 This study aimed to develop an effective malaria treatment, especially for the hepatic phase
98 infection. By encapsulating combination of PQ and CQ into liposome, PQ will be effective for
99 treating the occurrence of acute infections by sporozoites and/or malaria relapse by the latent
100 phase of hypnozoites in the liver, while the CQ loaded in liposomes can provide prophylactic
101 therapy for erythrocytic phase infection. It has been known that in hepatic phase infection,
102 sporozoites will only specifically attack hepatocytes rather than other non-parenchymal cells in

103 the liver. Thus, the specific delivery intended for hepatocytes will be useful for increasing the
104 efficacy and decreasing the toxicity of PQ and CQ for malaria therapy.

105 The use of liposome has been reported as carrier for PQ and CQ (Stensrud *et al.*, 2000; Qiu,
106 Jing and Jin, 2008; Stela Santos-Magalhães and Carla Furtado Mosqueira, 2009), but there has
107 been no previous research on its application for combination of both drugs. Therefore, in this
108 study, we prepared dual drug loading of PQ and CQ in liposome. We found that dual loading PQ
109 and CQ affected liposomal drug encapsulation efficiency and reduced their releases from
110 liposome.

Manuscript Review Only

112 2. Materials and Methods

113 2.1 Materials

114 In this study, primaquine bisphosphate (PQ) was purchased from Sigma-Aldrich Inc. (Rehovot,
115 Israel). The chloroquine diphosphate (CQ) was a product of Sigma-Aldrich®, Gyeonggi-do,
116 South Korea. Hydrogenated soya phosphatidylcholine (HSPC) and methoxy-(polyethylene-
117 glycol)-distearylphosphatidyl-ethanolamine (mPEG-DSPE, PEG mean molecular weight, 2000)
118 were bought from NOF Inc. (Tokyo, Japan). Cholesterol was a product of Wako Pure Chemical
119 Industries Inc. (Osaka, Japan). Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) and disodium
120 hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) were product of Merck® (Darmstadt, Germany). Sephadex® G-
121 50 was purchased from Sigma-Aldrich Inc. (Steinheim, Germany). The organic solvents, i.e.
122 chloroform and methanol, were products of Merck® (Darmstadt, Germany). Deionized water
123 (Otsuka Inc., Lawang, Indonesia) was used as water solvent. All other chemicals and reagents
124 were the finest grade available.

125

126 2.2 Determination of optimal incubation for preparation of liposome

127 Liposome containing single drug was generated by using CQ as drug model to determine
128 optimal condition for loading drug. Liposome was prepared by the thin-film method (Miatmoko
129 *et al.*, 2016) at a molar ratio of 55:45:5 for HSPC, cholesterol, and DSPE-mPEG₂₀₀₀,
130 respectively. Each lipid compound was dissolved in chloroform, then taken at appropriate
131 amounts and put into a round bottom flask. The chloroform was then completely removed using
132 a vacuum rotary evaporator in a water bath (Buchi Rotavapor R-3, Flawil, Switzerland) at 60°C,
133 so a thin dry film would be formed in the bottom of the flask. This thin layer was then hydrated
134 with citrate buffer pH 5.0. In order to prepare homogenous liposome suspension, the mixture was

135 then vortexed followed with sonication with a waterbath sonicator for about 15 minutes.
136 Furthermore, the mixture was passed through a polycarbonate membrane with an extruder
137 (Avanti[®], Alabaster, Alabama, US) to obtain homogenous particle size of liposome at a size of
138 100 nm.

139 The drug loading was carried out by transmembrane pH gradient method by eluting the
140 liposome through a Sephadex[®] G-50 column with phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4. The CQ
141 solution in aquadest was then added at drug-lipid of 1:5. The drug-liposome mixtures were then
142 incubated at certain temperature, which were 50°C and 60°C, at different period of incubation,
143 i.e. 10, 20, and 30 minutes.

144

145 *2.3 Determination of optimal drug to lipid ratios for preparation of liposome*

146 To determine optimal drug to lipid ratio for preparation of liposome, the PQ or CQ was loaded
147 as single drug component in the liposome. The drug loading was carried out by transmembrane
148 pH gradient method by eluting liposome, which was hydrated with citrate buffer pH 5.0, through
149 a Sephadex[®] G-50 column with phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4. The PQ or CQ solution in
150 aquadest was then added at determined weight of drug-lipid ratio i.e. 1:3, 1:5, and 1:10. The
151 drug-liposome mixtures were then incubated at 60°C for 20 minutes. To separate liposomal drug
152 from the free drug, the mixture was then eluted through Sephadex[®] G-50 column with PBS pH
153 7.4.

154 The entrapped PQ or CQ concentration was measured with an UV Spectrophotometer
155 (Shimadzu, Kyoto, Japan) at $\lambda = 282$ nm or $\lambda = 330$ nm for PQ or CQ, respectively, after lysing
156 with methanol (50% v/v). The encapsulation efficiency was calculated as follows:

157

$$\text{Percent of drug loading} = \frac{\text{amount of drug entrapped inside liposome}}{\text{total amount of drug}} \times 100\%$$

2.3 Preparation of liposome loading combination of PQ and CQ

At first, to prepare liposome loading combination of PQ and CQ, the lipid components were processed as previously described. Then, for preparation of control liposome containing drug, PQ and CQ amount was added at a weight drug:lipid ratio of 1:10 and 1:3 for PQ and CQ respectively, while for liposome loading combination of PQ and CQ, the drugs were added at a weight ratio of 1:3 for total PQ+CQ and lipid, respectively, with composition as shown in Table 1. During the drug loading, the drug-liposome mixtures was incubated at 60°C for 20 minutes.

The entrapped PQ and CQ concentration was measured with an UV Spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) using a derivative order 1 method (data unpublished) at $\lambda = 280$ nm or $\lambda = 346$ nm for PQ or CQ, respectively, by using methanol (50% v/v) for lysing the liposome vesicle.

2.4 Determination of particle size and ζ -potential of liposome

In order to determine the particle and ζ -potential of liposome, the sample was diluted with deionized water at appropriate dilution. The average particle size and ζ -potential of the liposomes were then measured by a cumulative method and electrophoretic mobility, respectively, with a light scattering photometer (Delsa™ Nano C Particle Analyzer, Beckman Coulter Inc., Indianapolis, US) at 25°C.

2.5 In vitro drug released from liposome

180 The *in vitro* study of PQ and CQ released from liposome was carried out by placing liposome
181 sample in dialysis tubing Spectra Por®7 with molecular weight cut-off (MWCO) 3,500
182 (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA). The dialysis media was 50 mL of
183 PBS pH 7.4. The study was performed with continuous stirring at a speed of 400 rpm in a water
184 bath at 37°C.

185 At determined sampling points, about 2 mL aliquots were withdrawn from the media and
186 replaced the same volume of PBS pH 7.4. The PQ and CQ concentration was measured with a
187 spectrophotometric method using a derivative order 1 method (data unpublished) at $\lambda = 280$ nm
188 or $\lambda = 346$ nm for PQ or CQ, respectively. A Wurster's correction was used for calculating the
189 the cumulative amount of drug released.

190

191 2.10 Statistical analysis

192 The data were in triplicates and presented as the mean \pm S.D. The statistical analysis that was
193 a one-way ANOVA followed by LSD post-hoc test was performed to determine the significance
194 of the difference. A *P* value less than 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1 Determination of optimal condition for loading PQ and CQ into liposome

The loading of PQ and CQ into liposome was prepared by remote loading of drug with a pH gradient using citrate buffer pH 5.0 as the intraliposomal phase and PBS pH 7.4 as the outer phase. At first, we evaluated the effect of temperature and period of incubation by using CQ as drug model. As shown in Table 2, all liposomes were produced in similar particle size, about 126 nm, with slight negatively charge of ζ -potential of approximately -15 mV. Moreover, by using this transmembrane pH gradient method, it was only about 17-22% of CQ could be loaded into liposome. There were no significant differences on encapsulation efficiency of liposome CQ by using different temperatures at different incubation period as shown in Table 2. However, incubating the mixtures of liposome and CQ solution at 60°C for 20 minutes produced optimal encapsulation efficiency of CQ into liposome.

Furthermore, we determined the optimal drug-to-lipid ratio for the entrapment of PQ and CQ in liposome. Decreasing the drug to lipid ratio had increased the encapsulation efficiency of PQ in liposome. Liposome PQ that was prepared at drug to lipid ratio of 1:10, PQ1-L10, showed the highest encapsulation efficiency, which was 66.4% as shown in Table 3. On the contrary, CQ could be optimally loaded at high drug to lipid ratio i.e. 1:3 (CQ1-L3) with encapsulation efficiency of 60.1%. From these results, a 20-min incubation at 60°C and PQ-to-lipid ratio of 1:10 and CQ to-lipid ratio of 1:3 (w/w) were chosen for loading of drug to liposome.

3.2 Dual loading of PQ and CQ into liposome

In order to prepare liposome loading combination of PQ and CQ, the liposome was added with PQ and CQ solution at determined weight drug:lipid ratio, which were 0.5:0.5:3; 0.25:0.75:3;

219 and 0.13:0.87:3 for PQ:CQ:total lipid, respectively, as shown in Table 1. Compared to single
220 drug-loaded liposome, combining PQ and CQ into liposome reduced drug encapsulation
221 efficiency significantly (Fig. 1). Addition CQ into liposome highly reduced PQ encapsulation,
222 which was declined from 72% (P1C0 liposome) to 6% for P1C1 liposome. Moreover, PQ also
223 decreased liposomal encapsulation of CQ. Compared to single CQ liposome (P0C1 liposome),
224 dual drug loaded-liposome had lower CQ loading, which was 56% reduced to 31% for P1C1
225 liposome. The ratio of PQ-CQ also played important role for determining liposomal drug
226 encapsulation, which the lower the amount proportion of CQ to PQ resulted in lower
227 encapsulation of PQ, as achieved in P1C1 liposome. While increasing the CQ ratio did not
228 produce significant differences on PQ encapsulation.

230 3.3 Evaluation of *in vitro* drug released from liposome

231 The *in vitro* drug released from liposomes were evaluated by immersing liposomes in PBS, pH
232 7.4 (Fig. 2). Compared with single drug loaded-liposome, either PQ or CQ were released slower
233 than those of P1C0 and P0C1 liposomes. About 63% of PQ content was released from P1C0
234 liposome over 48 hours, while it was reduced up to 44% in the presence of CQ encapsulated in
235 P1C1 liposome. CQ has similar profile of liposomal drug release, which showed about half
236 reduction of drug released from P1C1 liposome in PBS pH 7.4 compared to single CQ-loaded
237 liposome (P0C1 liposome).

240 4. Discussion

241 The characteristics of liposomes are highly affected by many factors including temperature
242 and period of incubation, and also drug to lipid ratio (Qiu, Jing and Jin, 2008). In this study, we
243 have carried out study to prepare liposomes for dual drugs loading, which were PQ and CQ. In
244 addition, the amount of drug released from liposomes strongly depends on the physicochemical
245 properties of liposome membranes and its encapsulated drugs (Liang, 2010). This study aimed to
246 determine the effect of loading combination of PQ+CQ, which was compared to the single drug,
247 on the physicochemical characteristics and the rate of release of PQ and CQ from liposome.

248 The liposome was prepared by thin film hydration method with active drug loading using a
249 transmembrane pH gradient. The high pH of the extraliposomal phase will result in minimal drug
250 ionization, so that the drug can diffuse into the intraliposomal phase that has an acid pH. After
251 the drug enters the internal phase, it will turn into ionized forms and get trapped due to pH
252 differences in the liposome (Fenske and Cullis, 2005; Sur *et al.*, 2014).

253 Based on the results, there was no significant difference in particle size. All liposomes had
254 mean particle size of around 100-150 nm, because of the same main components of the
255 liposome, i.e. HSPC and cholesterol (Qiu, Jing and Jin, 2008; Yadav *et al.*, 2011). At this range
256 of particle size, the liposome could be preferentially accumulated in the hepatocytes by passing
257 through the endothelial fenestrae of liver sinusoid, so that it can directly lead to the hepatic tissue
258 target, increase drug therapeutic effects, and reduce toxic effects (Stensrud *et al.*, 2000).

259 At first, the optimal condition for loading drug into liposome was determined. It has been
260 reported that the temperature and period of incubation depend on the composition and ratio of
261 the drug to lipid, so it must be determined experimentally (Abraham *et al.*, 2004). For
262 preparation of liposome, the results showed that there were no significant effect of increasing

263 temperature, from 50°C to 60°C, on the encapsulation efficiency of CQ ($P > 0.05$). Incubating the
264 drug-liposome mixtures at 60°C for 20 minutes had been preferred as liposomal preparation
265 method for further experiments. The loading rate and encapsulation efficiency of doxorubicin in
266 liposomes containing HSPC and cholesterol as lipid membrane constituents were reported to be
267 the highest at an incubation temperature of 60°C, which is the temperature above T_m HSPC i.e.
268 52°C (Monteiro *et al.*, 2014; Dondilkar and Murthy, 2016). However, it can be seen that the
269 encapsulation efficiency of CQ at drug:lipid ratio of 1:5 was still small. Then we further
270 determine the optimal drug: lipid ratio. The results showed that if the highest ratio of CQ:lipid of
271 1:3, respectively, produced the highest CQ encapsulation efficiency. On the contrary, PQ
272 liposome had the greater encapsulation efficiency if the ratio of PQ: lipid were getting smaller
273 ($P < 0.05$), at optimal drug to lipid ratio of 1:10. This is possibly due to the differences in pKa
274 values of PQ, which are 3.2 and 10.4, and CQ i.e. 8.10 and 9.94, resulting in different amount of
275 non-ionized drug molecules (Verbeeck *et al.*, 2005). It has been previously reported that the
276 amount of encapsulation efficiency could be depend on the physicochemical properties of
277 trapped drugs (Stensrud *et al.*, 2000). The amount of non-ionized PQ molecules was more than
278 those of CQ, so the smaller drug to lipid ratio is needed. It correlates well with the study that
279 states the large amount of the drug enter and get trapped inside liposome will be able to impair
280 the pH gradient, thus inhibiting liposomal drug uptake (Qiu, Jing and Jin, 2008).

281 Combining PQ+CQ into liposome resulted in lower drug loading than single drug-loaded
282 liposomes, which is consistent with previous study (Meng *et al.*, 2016). This is because of the
283 similar structures and physicochemical properties of PQ and CQ, so it might be interactions
284 between them in the intraliposomal phase.

285 The dual drug loaded-liposome was then evaluated for *in vitro* drug release. The results
286 showed that the liposome loading combination of PQ+CQ had slower drug release than single
287 drug-loaded liposome. It has been reported that entrapment of two different drugs in liposome
288 could prolong drug releases (Gürsoy, Kut and Özkirimli, 2004).

289 The dual drug loading of PQ and CQ into liposome, wwhich composed of HSPC,
290 cholesterol and DSPE-mPEG₂₀₀₀ as lipid components, highly affected drug encapsulation
291 efficiency and drug release. It is important to produce high drug loading and tailor drug delivery
292 for deliberate release of the drug in an appropriate manner in order to achieve high accumulation
293 in liver tissue for therapy of hepatic stage malaria. However, further investigation is still required
294 to evaluate the pharmacokinetic profiles and activity of dual PQ+CQ-loaded liposome.

4. Conclusions

In this study, we prepared liposomal containing dual drug loading, which were PQ and CQ, then evaluated for drug loading and *in vitro* drug release. Nano-sized particle, high drug encapsulation, and slow drug release were achieved by combinely loading PQ and CQ at 1:1 weight ratio. This finding suggested that dual PQ+CQ-loaded liposome could be potentially used for high liver accumulation in hepatic stage malaria therapy.

303 **5. Acknowledgements**

304 This work was supported by grants from the Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi
305 provided by the Ministry of Research, Science, and Technology of Republic Indonesia.

306

307 **6. Conflicts of interest**

308 The authors declare no conflicts of interest or financial interests in any product or service
309 mentioned in this article, including grants, employment, gifts, stock holdings, honoraria,
310 consultancies, expert testimony, patents, and royalties.

312 **Figure legends**

313 **Figure 1** The characteristics of (A) particle size, (B) polydispersity index, (C) ζ -potential, and (D)
314 encapsulation efficiency of liposome encapsulating PQ, CQ, and combination of PQ+CQ loaded
315 by incubating the mixtures at 60°C for 20 minutes. Each value represents mean \pm S.D. (n=3).
316 * $P < 0.05$ compared with P1C0. # $P < 0.05$ compared with P0C1

317
318 **Figure 2** Profiles of release of (A) PQ and (B) CQ from single drug-loaded liposome (P0C1 and
319 P1C0) and dual drug-loaded liposome (P1C1) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 at
320 37°C.

321

322

323 **References**

- 324 Abraham, S. A. *et al.* (2004) 'In Vitro and in Vivo Characterization of Doxorubicin and
325 Vincristine Coencapsulated within Liposomes through Use of Transition Metal Ion
326 Complexation and pH Gradient Loading', *Clinical Cancer Research*, 10(2), pp. 728–738.
327 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-1131-03.
- 328 Allen, T. M. and Cullis, P. R. (2013) 'Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical
329 applications', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 65(1), pp. 36–48. doi:
330 10.1016/j.addr.2012.09.037.
- 331 Baratta, J. L. *et al.* (2009) 'Cellular organization of normal mouse liver: A histological,
332 quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis', *Histochem Cell Bio*,
333 131(6), pp. 713–726. doi: 10.1007/s00418-009-0577-1.Cellular.
- 334 Barenholz, Y. (2012) 'Doxil®-The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned', *J Control*
335 *Release*. *J Control Release*, pp. 117–134. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.020.
- 336 Chu, C. S. and White, N. J. (2016) 'Management of relapsing Plasmodium vivax malaria.',
337 *Expert review of anti-infective therapy*. Taylor & Francis, 14(10), pp. 885–900. doi:
338 10.1080/14787210.2016.1220304.
- 339 Dondilkar, K. K. and Murthy, R. S. R. (2016) 'Studies on pH gradient loading of amphoteric
340 drug (Doxorubicin hydrochloride) into liposome', *MIT International Journal of*
341 *Pharmaceutical Sciences*, 2(1), pp. 1–6.
- 342 Fasinu, P. S. *et al.* (2016) 'Pathway-specific inhibition of primaquine metabolism by
343 chloroquine/quinine', *Malaria Journal*. BioMed Central, 15(1), p. 466. doi:
344 10.1186/s12936-016-1509-x.
- 345 Fenske, D. B. and Cullis, P. R. (2005) '[1] Entrapment of Small Molecules and Nucleic Acid –

346 Based Drugs in Liposomes', in *Methods in Enzymology*, pp. 7–40.

347 Gonzalez-Ceron, L. *et al.* (2015) 'Effectiveness of combined chloroquine and primaquine
348 treatment in 14 days versus intermittent single dose regimen, in an open, non-randomized,
349 clinical trial, to eliminate Plasmodium vivax in southern Mexico.', *Malaria journal*.
350 BioMed Central, 14(1), p. 426. doi: 10.1186/s12936-015-0938-2.

351 Gürsoy, A., Kut, E. and Özkirimli, S. (2004) 'Co-encapsulation of isoniazid and rifampicin in
352 liposomes and characterization of liposomes by derivative spectroscopy', *International*
353 *Journal of Pharmaceutics*, 271(1–2), pp. 115–123. doi: 10.1016/j.ijpharm.2003.10.033.

354 Jong, E. C. and Nothdurft, H. D. (2001) 'Current drugs for antimalarial chemoprophylaxis: a
355 review of efficacy and safety.', *J. Trav. Med.*, 8(Suppl 3), pp. 48–56. Available at:
356 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12186676>.

357 Karyana, M. *et al.* (2016) 'Treatment-seeking behaviour and associated costs for malaria in
358 Papua, Indonesia', *Malaria Journal*. BioMed Central, 15(1), p. 536. doi: 10.1186/s12936-
359 016-1588-8.

360 Kedar, P. *et al.* (2014) 'Primaquine-induced severe methemoglobinemia developed during
361 treatment of Plasmodium vivax malarial infection in an Indian family associated with a
362 novel mutation (p.Agr57Trp) in the CYB5R3 gene', *Clinica Chimica Acta*, 437, pp. 103–
363 105. doi: 10.1016/j.cca.2014.07.015.

364 Kohli, A. G. *et al.* (2014) 'Designer lipids for drug delivery: From heads to tails.', *Journal of*
365 *controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. Elsevier B.V., 190,
366 pp. 274–287. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.047.

367 Liang, Y. (2010) *Drug Release and Pharmacokinetic Properties of Liposomal Db-67*, Thesis.

368 Longley, R. J. *et al.* (2016) 'High Efficacy of Primaquine Treatment for Plasmodium vivax in

- 369 Western Thailand', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , 95(5), pp.
370 1086–1089. doi: 10.4269/ajtmh.16-0410.
- 371 Marcsisin, S. R., Reichard, G. and Pybus, B. S. (2016) 'Primaquine pharmacology in the context
372 of CYP 2D6 pharmacogenomics: Current state of the art', *Pharmacology and
373 Therapeutics*. Elsevier B.V., 161, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.011.
- 374 Meng, J. *et al.* (2016) 'Combination Therapy using Co-encapsulated Resveratrol and Paclitaxel
375 in Liposomes for Drug Resistance Reversal in Breast Cancer Cells *in vivo*', *Scientific
376 Reports*. Nature Publishing Group, 6(March), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep22390.
- 377 Miatmoko, A. *et al.* (2016) 'Evaluation of Cisplatin-Loaded Polymeric Micelles and Hybrid
378 Nanoparticles Containing Poly (Ethylene Oxide) -Block- Poly (Methacrylic Acid) on
379 Tumor Delivery', (January), pp. 1–8.
- 380 Mishra, M. *et al.* (2017) 'Comprehensive review on various strategies for antimalarial drug
381 discovery', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 125, pp.
382 1300–1320. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.11.025.
- 383 Monteiro, N. *et al.* (2014) 'Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine.', *Journal
384 of the Royal Society Interface*, 11(101), p. 20140459. doi: 10.1098/rsif.2014.0459.
- 385 Owens, D. E. and Peppas, N. A. (2006) 'Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of
386 polymeric nanoparticles', *International Journal of Pharmaceutics*, 307, pp. 93–102. doi:
387 10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.
- 388 Prudêncio, M., Rodriguez, A. and Mota, M. M. (2006) 'The silent path to thousands of
389 merozoites: the Plasmodium liver stage.', *Nature reviews. Microbiology*, 4(11), pp. 849–
390 56. doi: 10.1038/nrmicro1529.
- 391 Qiu, L., Jing, N. and Jin, Y. (2008) 'Preparation and *in vitro* evaluation of liposomal chloroquine

- 392 diposphate loaded by a transmembrane pH-gradient method', *International Journal of*
393 *Pharmaceutics*, 361(1–2), pp. 56–63. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.05.010.
- 394 Recht, J. *et al.* (2015) *Safety of 8-Aminoquinoline antimalarial medicines*, WHO Geneva. Edited
395 by E. Heseltine. WHO Press. doi: P3V183R1 [pii].
- 396 Stela Santos-Magalhães, N. and Carla Furtado Mosqueira, V. (2009) 'Nanotechnology applied to
397 the treatment of malaria ☆', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, pp. 560–575. doi:
398 10.1016/j.addr.2009.11.024.
- 399 Stensrud, G. *et al.* (2000) 'Formulation and characterisation of primaquine loaded liposomes
400 prepared by a pH gradient using experimental design', *International Journal of*
401 *Pharmaceutics*, 198(2), pp. 213–228. doi: 10.1016/S0378-5173(00)00338-0.
- 402 Sur, S. *et al.* (2014) 'Remote loading of preencapsulated drugs into stealth liposomes',
403 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
404 *Medical Sciences*, 111(6), pp. 2283–2288. doi: 10.1073/pnas.1324135111.
- 405 Swaan, L. M. B. and P. W. (2007) 'Endocytic mechanisms for targeted drug delivery', *Advanced*
406 *Drug Delivery Reviews*, 59(8), pp. 748–758. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- 407 The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013) 'CDC in Indonesia Factsheet',
408 *Centers for Disease Control and Prevention*, (CDC), pp. 1–2. Available at:
409 [http://www.cdc.gov/globalhealth/countries/indonesia/pdf/indonesia.pdf%5Cnwww.cdc.g](http://www.cdc.gov/globalhealth/countries/indonesia/pdf/indonesia.pdf%5Cnwww.cdc.gov/globalhealth/countries/indonesia/pdf/indonesia.pdf)
410 [ov/globalhealth/countries/indonesia/pdf/indonesia.pdf](http://www.cdc.gov/globalhealth/countries/indonesia/pdf/indonesia.pdf).
- 411 Verbeeck, R. K. *et al.* (2005) 'Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage
412 forms based on biopharmaceutics classification system (BCS) literature data:
413 Chloroquine phosphate, chloroquine sulfate, and chloroquine hydrochloride**This study
414 reflects the scientific opinion of the authors and not the policies of regulating agencies.'

- 415 *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(7), pp. 1389–1395. doi: 10.1002/jps.20343.
- 416 Wong, H. L. *et al.* (2006) 'A Mechanistic Study of Enhanced Doxorubicin Uptake and Retention
417 in Multidrug Resistant Breast Cancer Cells Using a Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticle
418 System', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), pp. 1372–
419 1381. doi: 10.1124/jpet.106.101154.drug.
- 420 World Health Organization (2015) *Guidelines for the treatment of malaria*. Third Edit,
421 *Guidelines For The Treatment of Malaria*. Third Edit. Geneva: WHO Press. doi:
422 10.1016/0035-9203(91)90261-V.
- 423 Yadav, A. V. *et al.* (2011) 'Stability aspects of liposomes', *Indian Journal of Pharmaceutical
424 Education and Research*, 45(4), pp. 402–413.
- 425

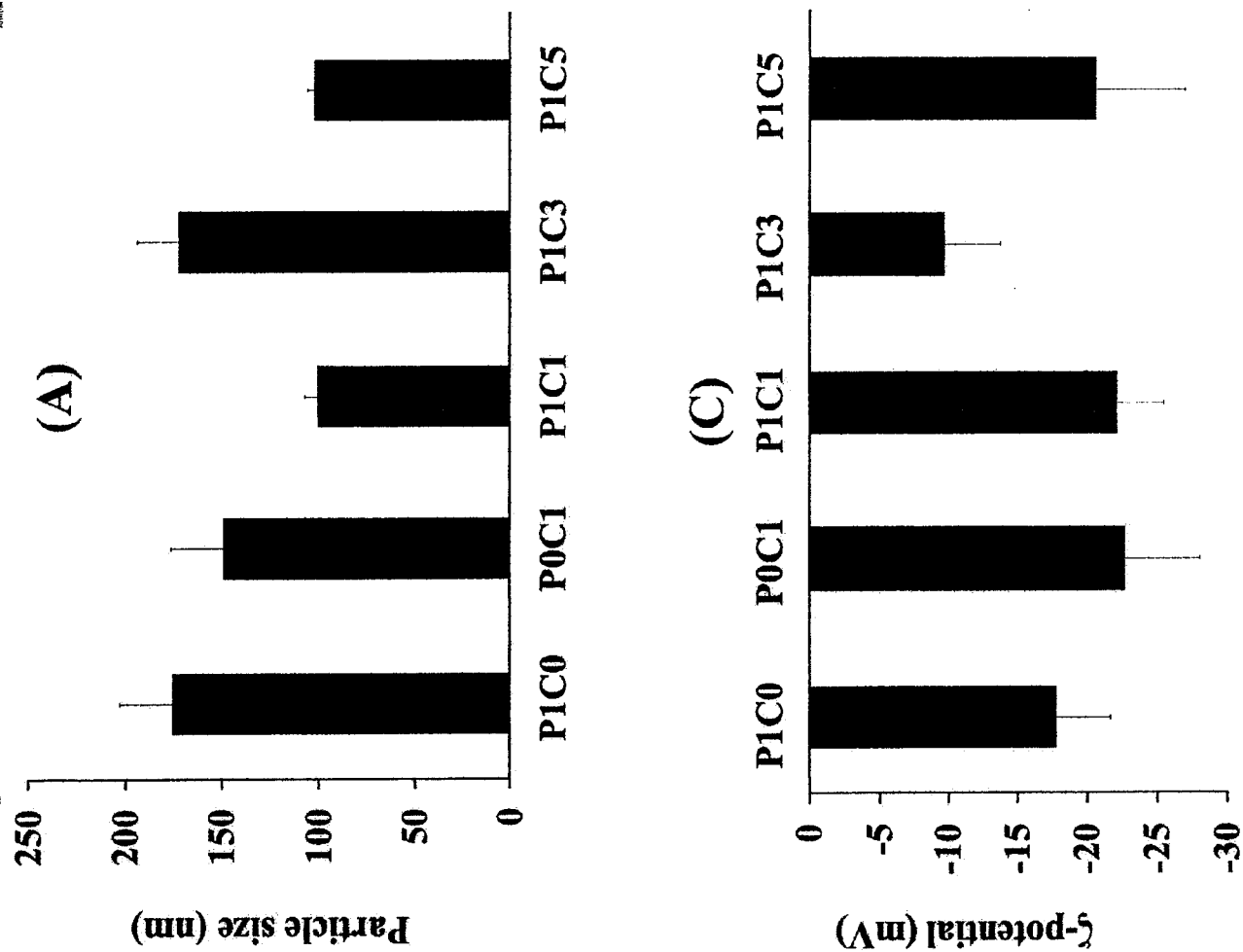
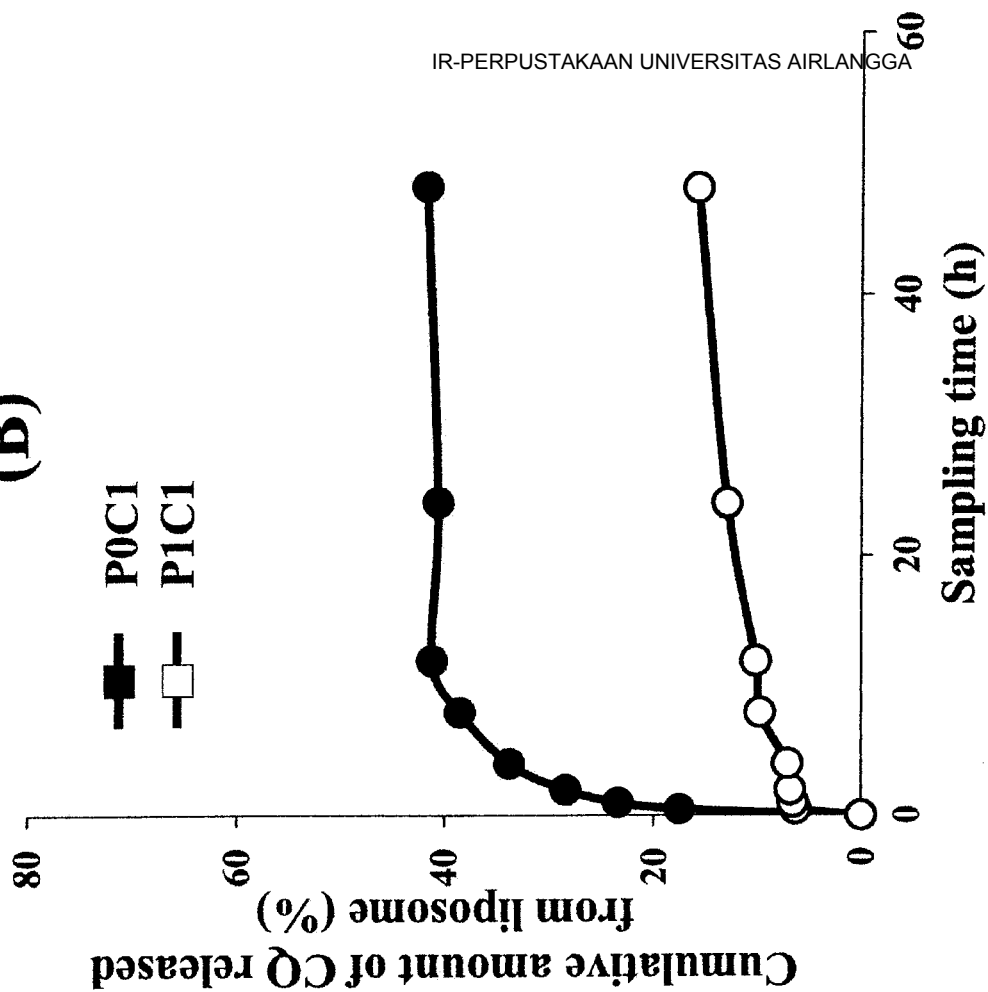


Figure 1

(B)



(A)

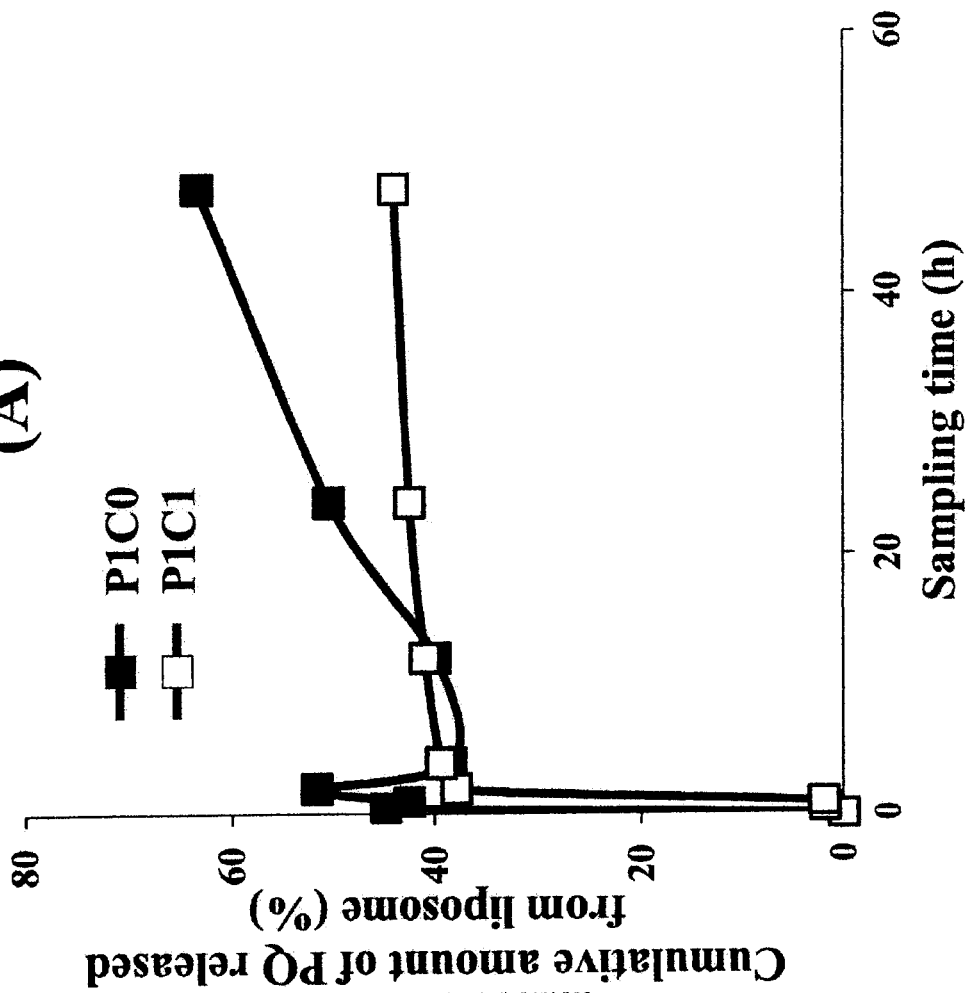


Figure 2

Table 1 Formulation of liposome loading combination of PQ and CQ

Component	Formulation				
	P1C0	P0C1	P1C1	P1C3	P1C5
PQ	1.00 mg	-	1.66 mg	0.83 mg	0.55 mg
CQ	-	3.33 mg	1.66 mg	2.48 mg	2.78 mg
HSPC	5.94 mg	5.94 mg	5.94 mg	5.94 mg	5.94 mg
DSPE-mPEG ₂₀₀₀	1.94 mg	1.94 mg	1.94 mg	1.94 mg	1.94 mg
Cholesterol	2.13 mg	2.13 mg	2.13 mg	2.13 mg	2.13 mg

P1C0, weight ratio of PQ:total lipid (1:10); P0C1, weight ratio of PQ:total lipid (1:3); P1C1, weight ratio of PQ:CQ:total lipid (0.5:0.5:3); P1C3, weight ratio of PQ:CQ:total lipid (0.25:0.75:3); P1C5, weight ratio of PQ:CQ:total lipid (0.13:0.87:3)

Table 2 Characteristics of liposome loading CQ prepared at different temperature and period of incubation with drug loaded at a weight ratio of 1:5 for drug and total lipid, respectively.

Incubation temperature	Period of incubation	Particle size (nm) ^{*)}	Polydispersity Index/PDI ^{*)}	ζ-Potential (mV) ^{*)}	Entrapment efficiency (%) ^{*)}
50°C	10 minutes	121.0 ± 6.5	0.30 ± 0.07	-11.3 ± 4.8	17.9 ± 3.2
	20 minutes	123.1 ± 7.5	0.35 ± 0.11	- 5.6 ± 2.0	21.5 ± 4.6
	30 minutes	126.2 ± 14.6	0.27 ± 0.05	-10.9 ± 6.1	15.0 ± 1.9
60°C	10 minutes	122.9 ± 21.4	0.31 ± 0.04	-16.9 ± 3.7	17.5 ± 2.1
	20 minutes	123.4 ± 19.2	0.32 ± 0.08	-23.5 ± 12.2	18.2 ± 2.2
	30 minutes	140.8 ± 30.5	0.26 ± 0.11	-19.8 ± 5.0	16.5 ± 2.8

^{*)} Each value represents the mean ± S.D. (n=3).

Surabaya, October 3rd 2018**LETTER OF ACCEPTANCE**

Dear Dr Andang Miatmoko,

The Scientific Committee of the **International Conference on Applied Pharmaceutical Science (ICoAPS) 2018** is pleased to inform you that your abstract has been accepted. We want to thank you for your interest in presenting and actively participating in our conference to be held in 18-19 October 2018.

Please find confirmation of your accepted abstract below:

Paper ID	O14-FS
Title	Encapsulating primaquine and chloroquine into liposome using pH gradient method
Paper Status	Accepted for Oral Presentation

As soon as the program is finalized, we will send you an email specifying the session, date, time and length of your presentation. Please note that only officially registered presenters may present their work during the conference.

Should you have any inquiry, please feel free to contact us through: icoaps-secretariat@ff.unair.ac.id.

For an up-to-date information regarding this conference, please visit our website: <http://ff.unair.ac.id/conferences/icoaps2018/pgs/58/abstract.html>.

Congratulations on your abstract, and we look forward to welcoming you to Surabaya.

Yours sincerely,

Andang Miatmoko, PhD, Apt.

Chairman

Secretariat:

Faculty of Pharmacy Universitas Airlangga
Dharmawangsa Dalam, Surabaya 60286, Indonesia
Phone +62315033710/Fax +62 31 5020514

Email: icoaps-secretariat@ff.unair.ac.id
Website: <http://ff.unair.ac.id/conferences/icoaps2018/>

Loading combination of primaquine and chloroquine into liposome

Andang Miatmoko, Ricky H Salim, Siti M Zahro*, Esti Hendradi

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga,
Dharmawangsa Dalam, Surabaya, Indonesia

Email: andang-m@ff.unair.ac.id

It has been known that primaquine is still the only drug that is effective for therapy of hepatic stage malaria. However, severe toxicity producing hemolysis limits its therapeutical use. Combining primaquine with chloroquine has been reported to improve primaquine efficacy as well as reduce its toxicity. This study aimed to evaluate the effect of loading combination of primaquine and chloroquine into liposome on physicochemical characteristics and drug release profile of liposome. The liposomes were composed of HSPC, Cholesterol, DSPE-mPEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 55:40:5, respectively. Liposome was prepared by thin film method. The particle size, PDI, and zeta potential were then determined to observe physical characteristics of liposomes. Moreover, encapsulation efficiency and cumulative amount of drug released from liposomes were quantified using spectrophotometry method. The results showed that liposome were produced in the particle size of 96.7 to 175.8 nm with PDI value of 0.21-0.39 and the zeta potential values were -22,11 to -9,70 mV. Combining primaquine and chloroquine into liposome resulted in lower drug encapsulation efficiency than that of single drug-loaded liposome. Furthermore, the amount of drug released from liposomes were decreased in liposome containing combination of primaquine and chloroquine. These results suggested that combining primaquine and chloroquine affected liposomal drug encapsulation and reduced the amount of drug released from liposome.

Keywords: loading combination, primaquine, chloroquine, liposome



Certificate

is awarded to:

Andang Miatmoko

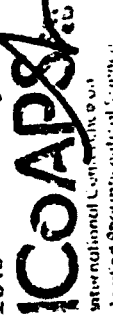
as Oral Presenter with topic entitled

**Encapsulating primaquine and chloroquine into liposome using
pH gradient method**

International Conference on Applied Pharmaceutical Sciences 2018

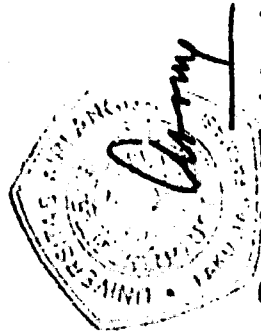
Surabaya, Indonesia, October 18-19th, 2018

2018



Andang Miatmoko, Ph.D., Apt.

Chairman



Dr. Umi Athiyah, M.S., Apt.

Dean of Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga

Encapsulating primaquine and chloroquine into liposome using pH gradient method

Andang Miatmoko*, Siti M Zahro, Ricky H Salim, Esti Hendradi

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Dharmawangsa Dalam, Surabaya, Indonesia

Email: andang-m@ff.unair.ac.id

Malaria has two disease development stages, which are hepatic phase and erythrocytic phase. It has been known that primaquine and chloroquine are the effective therapy for hepatic and erythrocytic stage of malaria, respectively. However, the drug resistance and non-specific drug biodistribution-related toxicity have limited their therapeutical uses. In this study, we evaluated the preparation process to determine optimal condition for encapsulating primaquine and chloroquine into liposome. Liposome was composed of HSPC, cholesterol, and DSPE mPEG₂₀₀₀ at a molar ratio 55:40:5, and prepared by a transmembrane pH gradient method with citrate buffer pH 5.0. Different incubation time and temperature, and also ratio of drug:lipid were used to prepare the liposome. Their particle size, ζ -potential, and drug encapsulation efficiency were then evaluated. The results showed that all liposome were produced in similar particle size and ζ -potential. However, increasing incubation temperature improved drug loaded into liposome with the highest encapsulation efficiency was obtained by 20 minutes of incubation at 60°C. For liposomal chloroquine, increasing drug:lipid ratio, which was 1:3, resulted in high encapsulation efficiency. On the contrary, primaquine could be highly loaded in liposome at low drug:lipid ratio, i.e. 1:10. In conclusion, primaquine and chloroquine could be optimally loaded into liposome by incubating the mixtures at 60°C for 20 minutes at drug lipid ratio of 1;3 and 1:10 for chloroquine and primaquine, respectively.

Keywords: encapsulating, primaquine, chloroquine, pH gradient