



9 772686 250000

e-ISSN : 2686-2506



Pengembangan Peptida Antimikroba Sintesis (KR-12) dalam Sistem Vesikular Liposom

*Diana Kurnia Apriani^{*1} Reiva Farah Dwiyanas², Anis Yohana Chaerunisaa³, Tina Rostinawati⁴*

¹Program Studi Magister Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21 Jatinangor 45363, Jawa Barat, Indonesia

²Departement Dermatologi Dan Venereologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran-Rumah Sakit Umum Dr. Hasan Sadikin, Bandung, Indonesia

³Departemen Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21 Jatinangor 45363, Jawa Barat, Indonesia

⁴Departemen Biologi Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jl Raya Bandung-Sumedang km 21 Jatinangor 45363, Jawa Barat, Indonesia

*E-mail: dnakurniaapriani@gmail.com

(Submit 07/12/2023, Revisi 12/12/2023, Diterima 16/12/2023, Terbit 09/01/2024)

Abstrak

Peptida Antimikroba (PAM) merupakan salah satu kandidat yang memiliki potensi sebagai anti-infeksi baru yang memiliki aktivitas biologi yang luas dengan peptida yang panjang. Peptida antimikroba dengan jumlah peptida yang lebih pendek juga menarik untuk dikembangkan yaitu peptida antimikroba sintesis KR-12. Namun, peptida antimikroba memiliki keterbatasan dalam hal stabilitas. Liposom merupakan pembawa vesikular yang dapat digunakan sebagai pembawa untuk mengatasi keterbatasan peptida sintesis KR-12. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan formulasi dan karakterisasi liposom berbahan aktif antimikroba sintesis KR-12 dengan variasi waktu sonikasi dan hidrasi. Metode yang digunakan pada formulasi liposom yaitu metode hidrasi lapis tipis dengan pengecilan ukuran partikel menggunakan sonikator. Liposom KR-12 yang dihasilkan menunjukkan liposom dispersi berwarna putih susu, berbau khas lesitin dan tanpa endapan. Terdapat variasi formula yaitu F1 (8:2) (30 menit sonikasi, 100 menit hidrasi); F2 (8:2) (45 menit sonikasi, 120 menit hidrasi); F3 (9:1) (30 menit sonikasi, 100 menit hidrasi); F4 (9:1) (45 menit sonikasi, 120 menit hidrasi). Berdasarkan hasil didapatkan ukuran partikel berturut yaitu 311,3 nm; 300,0 nm; 298,8 nm; 254,2 nm. Nilai indeks polidispersitas sebesar 0,393; 0,457; 0,354; dan 0,294, serta zeta potensial sebesar -71,2 mv; -56,3 mv; -68,48; dan -53,9 mv. Waktu sonikasi dan hidrasi yang lebih lama menghasilkan ukuran partikel yang lebih kecil. Konsentrasi kolesterol yang lebih rendah menghasilkan ukuran partikel yang lebih kecil. Berdasarkan hasil analisis efisiensi enkapsulasi didapatkan hasil yaitu F4 88,76%; F3 97,75%; F2 96,09%; F1 99,37%. Waktu hidrasi mempengaruhi penjerapan KR-12, semakin lama waktu hidrasi, semakin tinggi penjerapan KR-12 pada liposom. Preparasi

liposom KR-12 dengan metode hidrasi lapis tipis optimal pada waktu sonikasi 45 menit dan waktu hidrasi 120 menit..

Kata Kunci: KR-12, Peptida Antimikroba, Liposom

Pendahuluan

Peptida Antimikroba (PAM) merupakan salah satu kandidat yang memiliki potensi sebagai anti-infeksi baru untuk mengatasi krisis global pada resistensi antibiotik (1). *Cathelicidin* merupakan salah satu kelompok dari Peptida Antimikroba (PAM) (2). *Cathelicidin* ditemukan pada berbagai mamalia, dan satu-satunya jenis *Cathelicidin* yang ditemukan pada manusia adalah LL-37 (3). *Cathelicidin* memiliki aktivitas biologi yang luas, dengan peptida yang panjang untuk dikembangkan sebagai agen terapeutik, namun peptida antimikroba dengan jumlah peptida yang lebih pendek juga menarik untuk dikembangkan dengan biaya produksi yang lebih rendah(4).

Fragmen terkecil dari LL-37 dengan jumlah peptida yang lebih pendek yaitu Peptida sintesis KR-12 (5). KR-12 merupakan fragmen asam amino 18-29 dari LL-37 dan merupakan peptida terkecil yang mempertahankan aktivitas antibakteri (6). Fragmen N-terminal LL-12, yaitu residu atau asam amino 1-12 dari LL-37 menunjukkan tidak aktif melawan bakteri dan sel kanker, sedangkan C-terminal yang disebut sebagai residu atau asam amino 18-29 (KRIVQRIKDFLR-NH₂) dapat memberikan aktivitas antimikroba dan antikanker (7).

Peptida antimikroba KR-12, diproduksi dari *Cathelicidin* (LL-37) (8). KR-12 mempertahankan aksi antibakteri *Cathelicidin* (LL-37) dan memiliki toksisitas yang rendah terhadap sel manusia, sehingga menunjukkan potensi tinggi untuk berbagai aplikasi pada dunia farmasi. Hal ini dibuktikan dengan beberapa riset mengenai profil keamanan analog KR-12 dengan aktivitas antibakteri dan sitotoksitas yang kecil (1). KR-12 merupakan peptida dari LL-37 dengan turunan terpendek yang memiliki aktivitas antimikroba dan antiinflamasi yang sangat efektif. *Cathelicidin* (LL-37) ditemukan sebagai sistem kekebalan tubuh manusia yang sebagian kecil membentuk peptida antimikroba KR-12 (9). KR-12 dapat digunakan untuk mengatasi kelemahan fragmen *Cathelicidin* LL-37 sebagai agen terapeutik dengan biaya produksi yang tinggi terkait dengan produksi peptida panjang (1). Selain itu, *Cathelicidin* (LL-37) memberikan aktivitas hemolitik terdapat sel darah manusia, tetapi KR-12 tidak memberikan aktivitas hemolitik pada sel darah manusia (10).

Meskipun KR-12 dapat mempertahankan aksi antibakteri, tetapi kerentanan Peptida Antimikroba terhadap degradasi enzimatis dan protease tidak dapat diubah pada

kondisi fisiologis dan membutuhkan matriks perlindungan untuk mendapatkan pengobatan yang efisien. Liposom menawarkan kemungkinan dalam mengenkapsulasi dan melindungi peptida dari degradasi enzimatis dan protease (1) (11). Berdasarkan permasalahan di atas, peneliti tertarik untuk mengembangkan penghantaran obat dengan sistem vesikular liposom berbahan aktif peptida antimikroba sintesis KR-12.

Telah di laporkan bahwa peptida dalam struktur nano menunjukkan sitotoksitas yang lebih rendah, serta penurunan degradasi dan peningkatan efisiensi pada target yang diinginkan. Pada penelitian Blasi-Romero et al., (2023), mengatakan bahwa peptida antimikroba yang di formulasikan ke dalam bentuk nanoselulosa dan peptida antimikroba yang di formulasikan ke dalam bentuk nanopartikel polimer menunjukkan hasil yang lebih stabil dan efektivitas yang lebih besar (1)(12). Pemanfaatan nanoteknologi sebagai strategi yang tepat untuk meminimalkan keterbatasan karakteristik yang tidak diinginkan pada Peptida Antimikroba telah dilaporkan bahwa nanostruktur khususnya pada enkapsulasi liposom dapat menunjukkan toksisitas yang rendah, penurunan degradasi dan peningkatan efisiensi pengobatan (11).

Peptida antimikroba menjadi target potensial *novel treatment strategies* karena dapat memodulasi faktor virulensi bakteri sebagai antibiotik. (V. Wang et al., 2020). Pemberian antibiotik dilakukan seumur hidup, sehingga dibutuhkan agen terapi yang tidak menimbulkan resistensi dikarenakan pemakaian yang panjang. Penggunaan Peptida Antimikroba sebagai antibiotik tidak akan menimbulkan risiko resistensi (Wang et al., 2021).

Metode

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian diantaranya adalah *rotary evaporator* (IKA RV 10), sonikator probe (Hielscher Ultrasonikator UP200S), desikator, *Particle Size Analyzer* (PSA) (SZ-100-HORIBA), pH meter s20 (Mettler Toledo Seven Easy), *microplate spectrophotometer* (Epoch), Sentrifugator (NB-18000M Small-Size High Speed Refrigerate Centrifuge), dan alat gelas lainnya.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian diantaranya adalah KR-12 (Sintesis), lesitin kedelai (Archer Daniels Midlands), kolesterol (Dyeth), pro analisis kloroform (Merck), pro analisis methanol (Merck), natrium fosfat monobasa monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (BioWorld), natrium fosfat dibasa anhidrat (Na_2HPO_4) (BioWorld).

Prosedur Rinci

A. Formulasi Liposom

Pembuatan liposom menggunakan metode hidrasi lapis tipis dengan lesitin kedelai dan kolesterol dilarutkan kloroform : methanol (2:1) menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C dan kecepatan 60 rpm hingga terbentuk film lipid. Film lipid didiamkan semalam dan kemudian dihidrasi dengan buffer fosfat pH 7,4 pada 60 °C pada 200 rpm. Dilakukan variasi waktu hidrasi dan sonikasi (Tabel 1).

Tabel 1. Formulasi Liposom

Formula	Lesitin Kedelai (mg)	Kolesterol (mg)	Buffer (ml)	Variasi Hidrasi (menit)	Variasi Sonikasi (menit)
F1	90	10	20	100	30
F2	90	10	20	120	45
F3	80	20	20	100	30
F4	80	20	20	120	45

(11)

Loading dose KR-12 yang ditambahkan yaitu 1,5% dari total lipid menggunakan waktu hidrasi yang berbeda (13).

B. Pengecilan Ukuran Partikel

Dilakukan pengecilan ukuran dengan menggunakan sonikasi. Variasi waktu sonikasi dilakukan pada formula selama 30 menit dan 45 menit. Sonikasi dilakukan dengan 0,5 *cycle* dengan amplitude 50% (14).

C. Karakterisasi Liposom

Setelah pembentukan formulasi liposom, dilakukan karakterisasi dengan tujuan untuk mengevaluasi sifat fisiko-kimia yang dapat mempengaruhi stabilitas, selain itu kinerja liposom dalam aplikasi biomedis dan nanomedis sangat terkait dengan sejumlah parameter kontrol seperti ukuran partikel dan distribusi ukuran (polidispersitas), dan muatan permukaan (potensial zeta) dengan teknik analisis metode DLS (*Dynamic Light Scattering*), dilakukan pengenceran sampel 10 kali pada medium *aqueous* pada suhu kamar (30).

D. Efisiensi Enkapsulasi

20 µL larutan sampel (supernatan hasil sentrifugasi) diambil dan ditempatkan pada *well plate*. Setelah itu ditambahkan 2 µL larutan buffer fosfat pH 7,4. 200 µL larutan Bradford ditambahkan dan dihomogenkan. Diamkan 5 menit dan

absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm. Hal yang sama dilakukan pada blanko liposom. Persamaan berikut digunakan untuk menentukan efisiensi penyerapan KR-12 dalam liposom (11) (30).

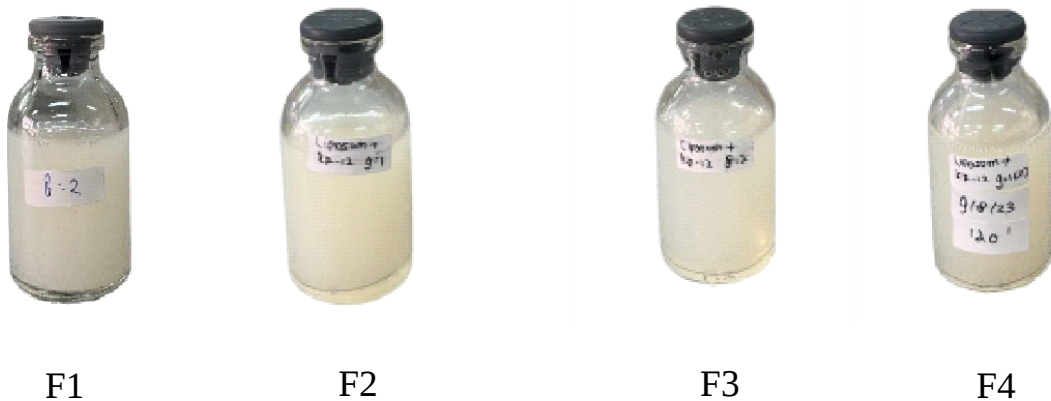
$$\%EE: \frac{C_{KR-12 \text{ yang digunakan}} - C_{KR-12 \text{ dalam supernatan}}}{C_{KR-12 \text{ yang digunakan}}} \times 100\%$$

Hasil

Formula Liposom

Dalam pembuatan liposom, secara organoleptis pada formula didapatkan dispersi liposom berwarna putih susu kekuningan berbau khas lesitin, berbentuk cair (Gambar 1). Teknik hidrasi lapis tipis atau yang disebut juga sebagai metode Bengham, merupakan metode tertua, paling umum, dan paling sederhana yang digunakan untuk preparasi liposom yang menghasilkan MLV's (*Multilamellar Vesicles*) (14).

Gambar 1. Formula Liposom (KR-12)



Keterangan :

F1: Liposom Soya : Kolesterol (8:2) (30 menit sonikasi, 100 menit hidrasi)

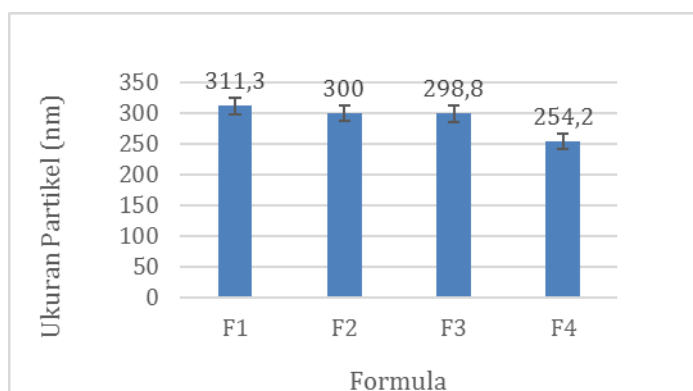
F2: Liposom Soya : Kolesterol (9:1) (30 menit sonikasi, 100 menit hidrasi)

F3: Liposom Soya : Kolesterol (8:2) (45 menit sonikasi, 120 menit hidrasi)

F3: Liposom Soya : Kolesterol (9:1) (45 menit sonikasi, 120 menit hidrasi)

Karakterisasi Liposom

Hasil ukuran partikel dapat dilihat pada Gambar 2. Ukuran partikel diukur dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) dengan metode *Dinamic Light Scattering* (DLS). Terdapat ukuran partikel yang berbeda dengan variasi waktu sonikasi dan waktu hidrasi. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan waktu sonikasi dan waktu hidrasi menghasilkan ukuran partikel semakin kecil. Selain itu, konsentrasi kolesterol yang lebih tinggi dalam formulasi liposom menghasilkan ukuran partikel yang lebih besar. Nilai ukuran partikel dari sampel setelah dilakukan sonikasi dan hidrasi didapatkan hasil F1 $311,30 \pm 12,4$ nm; F2 $300,06 \pm 15,9$ nm; F3 $298,8 \pm 25,3$ nm; F4 $254,36 \pm 24,5$ nm. Semua formulasi memenuhi syarat ukuran partikel, yaitu <300 nm.



Gambar 2. Ukuran Partikel Liposom KR-12 (n=3)

Keterangan :

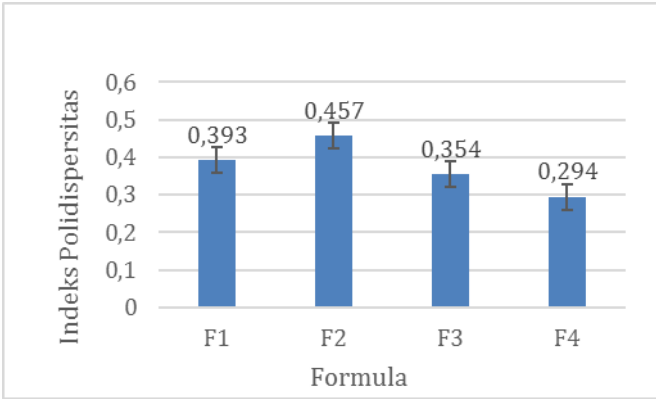
F1: Liposom Soya : Kolesterol (8:2) (30 menit sonikasi, 100 menit hidrasi)

F2: Liposom Soya : Kolesterol (8:2) (45 menit sonikasi, 120 menit hidrasi)

F3: Liposom Soya : Kolesterol (9:1) (30 menit sonikasi, 100 menit hidrasi)

F3: Liposom Soya : Kolesterol (9:1) (45 menit sonikasi, 120 menit hidrasi)

Distribusi ukuran partikel ditunjukkan oleh nilai indeks polidispersitas yang merupakan hasil kuadrat deviasi standar dibagi dengan diameter partikel rata-rata. Semakin mendekati nol nilai indeks polidispersitas maka distribusi semakin baik, semakin besar nilai indeks polidispersitas menunjukkan partikel yang terbentuk tidak seragam, sehingga formula akan terflokulasi dengan cepat. Nilai indeks polidispersitas dari sampel setelah dilakukan sonikasi dan hidrasi didapatkan hasil F1 $0,393 \pm 0,49$; F2 $0,457 \pm 0,32$; F3 $0,354 \pm 0,76$; F4 $0,294 \pm 0,72$ (Gambar 3). Pada liposom KR-12 dengan variasi waktu sonikasi dan hidrasi tidak mempengaruhi nilai indeks polidispersitas.



Gambar 3. Nilai Indeks Polidispersitas Liposom KR-12 (n=3)

Keterangan :

- F1: Liposom Soya : Kolesterol (8:2) (30 menit sonikasi, 100 menit hidrasi)
- F2: Liposom Soya : Kolesterol (8:2) (45 menit sonikasi, 120 menit hidrasi)
- F3: Liposom Soya : Kolesterol (9:1) (30 menit sonikasi, 100 menit hidrasi)
- F3: Liposom Soya : Kolesterol (9:1) (45 menit sonikasi, 120 menit hidrasi)

Zeta potensial merupakan parameter muatan listrik antara partikel koloid. Semakin besar nilai potensial zeta, maka akan semakin mencegah terjadinya flokulasi. Pengukuran potensial zeta digunakan untuk mengevaluasi hubungan antara muatan permukaan dan stabilitas. Nilai zeta potensial yang didapatkan adalah F1 -71,2±1,15 mv; F2 -56,3±3,02 mv; F3 -68,48±3,17 dan F4 -53,9±1,41 (Tabel 2). Berdasarkan karakterisasi potensial zeta memiliki stabilitas yang baik.

Formula	Ukuran Partikel (nm)	PDI	Potensial Zeta (mV)
F1	311,3±12,4	0,393±0,49	-71,23±1,15
F2	300,0±15,9	0,354±0,32	-56,33±3,02
F3	298,8±23,3	0,457±0,76	-68,43±3,17
F4	254,26±24,5	0,294±0,72	-53,90±1,42

Tabel 3. Karakterisasi Liposom KR-12 (n=3)

Keterangan :

- F1: Liposom Soya : Kolesterol (8:2) (30 menit sonikasi, 100 menit hidrasi)
- F2: Liposom Soya : Kolesterol (8:2) (45 menit sonikasi, 120 menit hidrasi)
- F3: Liposom Soya : Kolesterol (9:1) (30 menit sonikasi, 100 menit hidrasi)

F3: Liposom Soya : Kolesterol (9:1) (45 menit sonikasi, 120 menit hidrasi)

Efisiensi Enkapsulasi Liposom KR-12

Efisiensi enkapsulasi bertujuan untuk mengetahui kemampuan liposom dalam mengenkapsulasi KR-12 dengan berbagai konsentrasi kolesterol pada formula. Terdapat variasi waktu hidrasi untuk mengetahui pengaruh waktu hidrasi terhadap besarnya nilai penjerapan KR-12 yang dilakukan dengan menggunakan metode Bradford. Berdasarkan hasil nilai efisiensi enkapsulasi, diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi kolesterol maka menghasilkan nilai persentase efisiensi enkapsulasi yang lebih tinggi. Selain itu, waktu semakin lama waktu hidrasi, maka penjerapannya semakin tinggi (Tabel 4).

Tabel 4. Persentase Efisiensi Enkapsulasi Liposom KR-12 (1,5 mg) (n=3)

Formula	Efisiensi Enkapsulasi (%)
F1	88,76 ± 4,78
F2	95,75 ± 0,87
F3	96,09 ± 3,16
F4	99,37 ± 0,27

Keterangan :

F1: Liposom Soya : Kolesterol (9:1) (30 menit sonikasi, 100 menit hidrasi)

F2: Liposom Soya : Kolesterol (9:1) (45 menit sonikasi, 120 menit hidrasi)

F3: Liposom Soya : Kolesterol (8:2) (30 menit sonikasi, 100 menit hidrasi)

F3: Liposom Soya : Kolesterol (8:2) (45 menit sonikasi, 120 menit hidrasi)

Pembahasan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh lama waktu sonikasi dan hidrasi serta konsentrasi kolesterol terhadap hasil karakterisasi liposom mengenai ukuran partikel, nilai indeks polidispersitas, zeta potensial serta persentase efisiensi enkapsulasi pada KR-12. Bahan yang digunakan yaitu soya kedelai, kolesterol dan KR-12. Penambahan kolesterol sebagai pembentuk komponen vesikel bersamaan dengan

lesitin yang bertujuan untuk memperbaiki lapisan permukaan liposom, menghindari kebocoran lapisan liposom dan menjaga stabilitas liposom. Liposom tanpa kolesterol akan berinteraksi secara cepat dengan protein plasma seperti albumin, transferin dan makroglobulin. Protein tersebut akan cenderung menarik protein fosfolipid dari liposom dan akan menyebabkan ketidakstabilan fisik dari liposom. Kolesterol akan mengurangi interaksi antara protein plasma dengan protein tersebut. Oleh karena itu, kolesterol divariasikan untuk melihat pengaruh stabilitas sediaan liposom.

Penelitian yang dilakukan oleh Sulkowski (2005), menyatakan bahwa penambahan kolesterol ke lapisan ganda liposom dapat mencegah pertukaran lipid dan dapat meningkatkan stabilitas liposom (15), serta mampu mencegah agregasi (16). Selain itu, kolesterol memainkan peran penting dalam komposisi liposom dan salah satu struktural kritis dalam membran plasma sel manusia. Fluiditas dan permeabilitas vesikel sangat dipengaruhi oleh kolesterol melalui hidrogen yang mengikat asam lemak sehingga meningkatkan kerapatan (rigiditas) dan kekuatan mekanik (17).

Teknik hidrasi lapis tipis atau yang disebut juga sebagai metode Bengham, merupakan metode tertua, paling umum, dan paling sederhana yang digunakan untuk preparasi liposom pembentuk MLV's (*Multilamellar Vesicles*). (18). Metode ini merupakan proses standar pada preparasi liposom dalam skala laboratorium (19). Pada metode ini, semua lipid dan obat hidrofobik dilarutkan dalam pelarut organik yang sesuai (diklorometana, kloroform, etanol, atau kloroform-metanol) dengan menggunakan labu alas bulat untuk memastikan campuran homogen (19)(20). Pelarut organik diuapkan dibawah tekanan untuk membuat lapisan film tipis (21). Film tipis yang diperoleh kemudian dihidrasi pada suhu diatas transisi (T_m) dari lipid yang digunakan dengan menggunakan larutan buffer, proses hidrasi umumnya dilakukan pada suhu 60-70°C sebagai suhu fase transisi komponen lipid (22). Larutan hidrasi (buffer) dapat mengandung obat hidrofilik agar masuk ke dalam inti liposom. Pada bidang farmasi formulasi, dapat digunakan buffer fosfat pada pH 7,4. Tingkat hidrasi dapat menentukan efisiensi enkapsulasi obat, semakin lambat laju hidrasi, semakin tinggi efisiensi enkapsulasi. Perubahan ukuran partikel pada liposom, jenis lamellar dan distribusi partikel dapat dikontrol dengan menggunakan sonikasi. Sonikasi menghasilkan bentuk partikel SUV (*Small Unilamellar Vesicles*) (20).

Pada penelitian ini dibuat liposom menggunakan lesitin dan kolesterol. Pada pembuatan liposom diperoleh dispersi liposom berwarna putih susu dan berbau seperti telur (Gambar 1.). Setelah disimpan selama 1 minggu, dispersi liposom tidak mengalami pengendapan. Warna putih susu pada dispersi mengindikasikan terbentuknya liposom (23). Jika terbentuk kekeruhan berwarna kelabu berarti terbentuk dispersi nonliposomal, dan hal ini tidak terjadi dalam semua formula.

Terdapat empat formula dengan variasi waktu sonikasi dan hidrasi (Tabel 3), yang menunjukkan bahwa semakin lama waktu sonikasi dan hidrasi maka ukuran partikel semakin kecil. Pengukuran menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) dengan metode *Dinamic Light Scattering* (DLS). Partikel dengan ukuran 230-300 nm dapat menembus wilayah sebasa dan dapat tertahan di dalam folikel selama lebih dari 10 hari (24). Data yang didapatkan menunjukkan bahwa sonikator dapat memperkecil diameter vesikel liposom yang dihasilkan. Lamanya waktu sonikasi berkaitan dengan lamanya waktu interaksi energi ultrasonic ke fragmen bilayer liposom. Fragmen bilayer liposom yang berinteraksi dengan energi ultrasonic akan terpengaruh kestabilannya, selain itu terjadi agregasi dan fusi, sehingga mengakibatkan perubahan ukuran vesikel. Selain itu metode DLS juga dapat mengukur indeks polidispersitas. Nilai indeks polidispersitas yang lebih menunjukkan homogenitas ukuran partikel yang baik. Nilai indeks polidispersitas yang mendekati 0 menunjukkan dispersi ukuran partikel yang homogen, sedangkan nilai indeks polidispersitas $>0,7$ menunjukkan heterogenitas yang tinggi (25). Berdasarkan hasil yang diperoleh (Gambar 3) menunjukkan nilai indeks polidispersitas F4 KR-12 memiliki homogenitas ukuran partikel tertinggi karena memiliki nilai PDI yang paling mendekati 0 yaitu 0,294.

Pada formulasi Liposom KR-12 dengan formulasi F1 didapatkan nilai zeta potensial -71,23 $\pm$ 1,15 mv, F2 memiliki zeta potensial -68,48 $\pm$ 3,02 mv, pada F3 -56,33 $\pm$ 3,17 mv dan pada F4 memiliki nilai zeta potensial -53,9mv. Beberapa faktor yang mempengaruhi potensi zeta antara lain pH medium, kekuatan ion, konsentrasi tambahan zat dan suhu. Koloid dengan nilai potensial zeta yang tinggi (negatif atau positif) yang elektrik stabil sementara koloid dengan nilai potensial zeta rendah cenderung terflokulasi. Zeta Potensial dengan nilai 11-20 mv mendekati batas koagulasi, sedangkan yang memiliki nilai potensial zeta 41-50 mV menunjukkan stabilitas yang tinggi (26). Aturan praktis, nilai potensial zeta ± 30 mV akan memberikan stabilitas yang baik dan nilai potensial zeta ± 60 mV memiliki stabilitas yang sangat baik. Nilai potensial zeta sekitar ± 20 mV hanya memberikan stabilitas jangka pendek, nilai potensial zeta kisaran ± 5 mV menunjukkan agregasi yang cepat (27).

Analisis efisiensi enkapsulasi dengan menggunakan metode Bradford. Asam amino yang terdapat pada KR-12 khususnya asam amino basa dan asam amino aromatik akan berikatan dengan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (28). Berdasarkan hasil analisis efisiensi enkapsulasi, diketahui bahwa formula F3 dan F4 memiliki persentase lebih tinggi dibandingkan dengan F1 dan F2 (Tabel 4). Hal ini dikarenakan F3 dan F4 mengandung kolesterol lebih banyak dibandingkan dengan F1 dan F2. kolesterol memiliki hidrofobisitas yang tinggi sehingga dapat memperkuat pengemasan lapisan ganda fosfolipid (meningkatkan rigiditas), sehingga mengurangi permeabilitas membran (29). Selain konsentrasi kolesterol yang dapat mempengaruhi presentase efisiensi enkapsulasi, terdapat lama waktu hidrasi, dimana semakin lama waktu hidrasi, maka penjerapannya semakin tinggi. Pada data (Tabel 4) dapat diketahui bahwa semakin besar konsentrasi kolesterol yang ditambahkan dan semakin lama waktu hidrasi, maka nilai presentase efisiensi enkapsulasi akan semakin tinggi.

Kesimpulan

Berdasarkan formulasi liposom berbahan aktif peptida antimikroba sintesis KR-12 dengan menggunakan metode hidrasi lapis tipis didapatkan hasil bahwa waktu sonikasi dan hidrasi mempengaruhi parameter fisik liposom. Waktu sonikasi dan waktu hidrasi yang lebih lama menghasilkan ukuran partikel yang lebih kecil dan waktu hidrasi yang lebih lama menghasilkan efisiensi enkapsulasi yang tinggi. Preparasi liposom KR-12 dengan metode hidrasi lapis tipis optimal pada waktu sonikasi 45 menit dan waktu hidrasi 120 menit.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) Kementerian Keuangan Republik Indonesia yang telah mendanai riset ini dalam skema RISPRO INVITASI tahun 2023

Daftar Pustaka

1. Makowski, M., Silva, Í. C., Do Amaral, C. P., Gonçalves, S., & Santos, N. C. (2019). Advances in lipid and metal nanoparticles for antimicrobial peptide delivery. *Pharmaceutics*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110588>
2. Dombrowski, Y., & Schaubert, J. (2012). Cathelicidin LL-37: A defense molecule with a potential role in psoriasis pathogenesis. *Experimental Dermatology*, 21(5), 327–330. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01459.x>
3. Nagaoka, I., Tamura, H., & Reich, J. (2020). Therapeutic potential of cathelicidin peptide LL-37, an antimicrobial agent, in a murine sepsis model. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21175973>
4. Blasi-Romero, A., Ångström, M., Franconetti, A., Muhammad, T., Jiménez-Barbero, J., Göransson, U., Palo-Nieto, C., & Ferraz, N. (2023). KR-12 Derivatives Endow Nanocellulose with Antibacterial and Anti-Inflammatory Properties: Role of Conjugation Chemistry. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(20), 24186–24196. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c04237>
5. Jacob, B., Park, I. S., Bang, J. K., & Shin, S. Y. (2013). Short KR-12 analogs designed from human cathelicidin LL-37 possessing both antimicrobial and antiendotoxic activities without mammalian cell toxicity. *Journal of Peptide Science*, 19(11), 700–707.

6. Li, X., Li, Y., Han, H., Miller, D. W., & Wang, G. (2006). Solution structures of human IL-37 fragments and NMR-based identification of a minimal membrane-targeting antimicrobial and anticancer region. *Journal of the American Chemical Society*, 128(17), 5776–5785. <https://doi.org/10.1021/ja0584875><https://doi.org/10.1002/psc.2552>
7. Ren, S. X., Shen, J., Cheng, A. S. L., Lu, L., Chan, R. L. Y., Li, Z. J., Wang, X. J., Wong, C. C. M., Zhang, L., Ng, S. S. M., Chan, F. L., Chan, F. K. L., Yu, J., Sung, J. J. Y., Wu, W. K. K., & Cho, C. H. (2013). FK-16 Derived from the Anticancer Peptide LL-37 Induces Caspase-Independent Apoptosis and Autophagic Cell Death in Colon Cancer Cells. *PLoS ONE*, 8(5), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063641>
8. Yun, H., Min, H. J., & Lee, C. W. (2020). NMR structure and bactericidal activity of KR-12 analog derived from human LL-37 as a potential cosmetic preservative. *Journal of Analytical Science and Technology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s40543-020-00213-x>
9. Koczulla, R., Von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrücker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., Karl, A., Raake, P., Pfosser, A., Boekstegers, P., Welsch, U., Hiemstra, P. S., Vogelmeier, C., Gallo, R. L., Clauss, M., & Bals, R. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *Journal of Clinical Investigation*, 111(11), 1665–1672. <https://doi.org/10.1172/JCI17545>
10. Dawson, R. M., McAllister, J., & Liu, C. Q. (2010). Characterisation and evaluation of synthetic antimicrobial peptides against *Bacillus globigii*, *Bacillus anthracis* and *Burkholderia thailandensis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(4), 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.038>
11. Chaerunisaa, A. Y., Dewi, M. K., Sriwido, Joni, I. M., & Dwiyan, R. F. (2022). Development of Cathelicidin in Liposome Carrier Using Thin Layer Hydration Method. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 14(4), 178–185. <https://doi.org/10.22159/ijap.2022v14i4.44480>
12. Pan, L., Jiang, D., Pan, L., Meng, Z., Zhuang, Y., Huang, Y., Ye, F., Shi, C., Chen, J., & Pan, J. (2022). ICAM-1-targeted and antibacterial peptide modified polymeric nanoparticles for specific combating sepsis. *Materials and Design*, 222, 111007. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111007>
13. Yeo, L. K., Chaw, C. S., & Elkordy, A. A. (2019). The effects of hydration parameters and co-surfactants on methylene blue-loaded niosomes prepared by the thin film hydration method. *Pharmaceutics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/ph12020046>
14. Zhang, H. (2017). Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation. *Methods in Molecular Biology*, 1522, 17–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2

15. Sułkowski, W. W., Pentak, D., Nowak, K., & Sułkowska, A. (2005). The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure*, 744–747(SPEC. ISS.), 737–747. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.075>
16. Khadke, S., Stone, P., Rozhin, A., Kroonen, J., & Perrie, Y. (2018). Point of use production of liposomal solubilised products. *International Journal of Pharmaceutics*, 537(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.012>
17. Trucillo, P., Campardelli, R., & Reverchon, E. (2017). Supercritical CO₂ assisted liposomes formation: Optimization of the lipidic layer for an efficient hydrophilic drug loading. *Journal of CO₂ Utilization*, 18, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.02.001>
18. Zhang, H. (2017). Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation. *Methods in Molecular Biology*, 1522, 17–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2
19. Xiang, B., & Cao, D.-Y. (2018). Preparation of Drug Liposomes by Thin-Film Hydration and Homogenization. *Liposome-Based Drug Delivery Systems*, 1–11. https://doi.org/10.1007/978-3-662-49231-4_2-1
20. Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., & Alshaer, W. (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, 8(5), e09394. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>
21. Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics*, 9(2), 1–33. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
22. Lombardo, D., & Kiselev, M. A. (2022). Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543>
23. Abbasi, H., Kouchak, M., Mirveis, Z., Hajipour, F., Khodarahmi, M., Rahbar, N., & Handali, S. (2023). What We Need to Know about Liposomes as Drug Nanocarriers: An Updated Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 13(1), 7–23. <https://doi.org/10.34172/apb.2023.009>
24. Tampucci, S., Paganini, V., Burgalassi, S., Chetoni, P., & Monti, D. (2022). Nanostructured Drug Delivery Systems for Targeting 5- α -Reductase Inhibitors to the Hair Follicle. *Pharmaceutics*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020286>
25. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>

26. Németh, Z., Csóka, I., Semnani Jazani, R., Sipos, B., Haspel, H., Kozma, G., Kónya, Z., & Dobó, D. G. (2022). Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives. *Pharmaceutics*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091798>
27. Al Shuwaili, A. H., Rasool, B. K. A., & Abdulrasool, A. A. (2016). Optimization of elastic transfersomes formulations for transdermal delivery of pentoxifylline. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 102(February), 101–114. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.02.013>
28. Krohn, R. I. (2002). The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Current Protocols in Cell Biology*, 15(1), 1–28. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cba03hs15>
29. Wang, J. Y., Baek, Y., Jeong, E. W., & Lee, H. G. (2023). Effect of coenzyme Q10 encapsulation with different sterols on stability, antioxidant activity, and cellular properties of nanoliposomes. *Food Bioscience*, 56(June), 103179. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103179>
30. Sadeghi, S., Bakhshandeh, H., Ahangari Cohan, R., Peirovi, A., Ehsani, P., & Norouzian, D. (2019). Synergistic Anti-Staphylococcal Activity Of Niosomal Recombinant Lysostaphin-LL-37. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 72 9777–9792. <https://doi.org/10.2147/IJN.S230269>

