



UNIVERSITAS INDONESIA

**PERBANDINGAN PENGARUH LARUTAN
NaCl DAN CaCl₂ 150 mOsmol pH 5
TERHADAP DIAMETER LIPOSOM EPC-TEL 2,5
HASIL SONIKASI**

SKRIPSI

**MARIA FLORENCIA DESLIVIA
0105001057**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER UMUM
JAKARTA
JUNI 2009**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PERBANDINGAN PENGARUH LARUTAN
NaCl DAN CaCl₂ 150 mOsmol pH 5
TERHADAP DIAMETER LIPOSOM EPC-TEL 2,5
HASIL SONIKASI**

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi persyaratan untuk
memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia**

**MARIA FLORENCIA DESLIVIA
0105001057**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER UMUM
JAKARTA
JUNI 2009**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

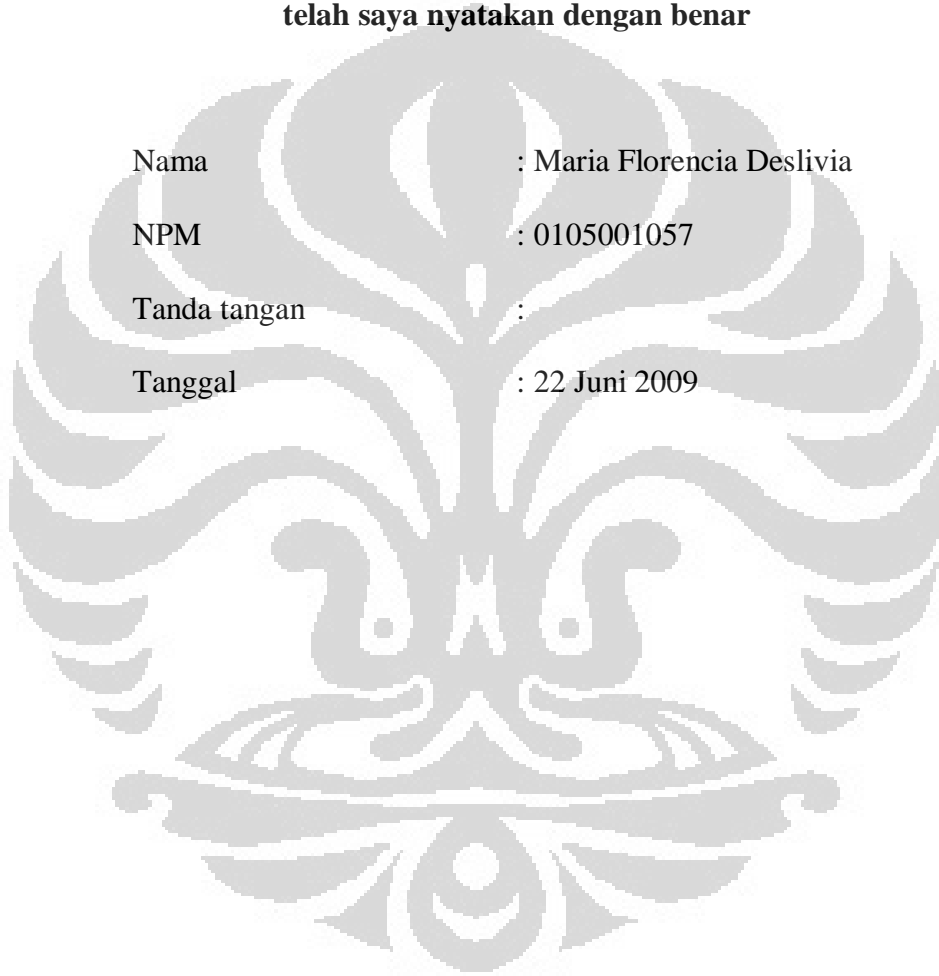
**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar**

Nama : Maria Florencia Deslivia

NPM : 0105001057

Tanda tangan :

Tanggal : 22 Juni 2009



LEMBAR PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Maria Florencia Deslivia
NPM : 0105001057
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Judul Skripsi : Perbandingan Pengaruh Larutan NaCl dan CaCl₂
150 mOsmol pH 5 terhadap Diameter Liposom
EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar sarjana pada Program Pendidikan Dokter Umum Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. dr. Ernie H. Purwaningsih, MS ()

Penguji : dr. Zarni Amri, MPH ()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 27 Juni 2009

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala rahmat dan anugerahNya yang diberikan kepada penulis sehingga dapat merampungkan skripsi dengan judul **"Perbandingan Pengaruh Larutan NaCl dan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 Terhadap Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi"**.

Penulisan skripsi ini bertujuan memenuhi salah satu persyaratan kelulusan untuk memperoleh gelar akademis Sarjana Kedokteran pada Program Pendidikan Dokter Umum Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah memberi bantuan dan bimbingan pada penulis dalam menyelesaikan laporan penelitian ini. Ucapan terima kasih ditujukan kepada:

1. Dr. dr. Erni H. Purwaningsih, MS yang telah mencurahkan waktu, tenaga dan perhatian untuk membimbing, memberikan nasihat dan bantuan kepada penulis selama penelitian dan pembuatan laporan penelitian.
2. Staf Departemen Fisika Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, yang telah meminjamkan komputer dengan program Image Pro Plus di dalamnya kepada kelompok penelitian penulis serta meluangkan waktu untuk membagi ilmu mengenai cara pemakaian program.
3. Staf dan karyawan Departemen Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, yaitu pak Rusyono, pak Sukidi, ibu Ani Widayati, dan ibu Sri Wulandari yang secara langsung maupun tak langsung telah membantu penulis selama penelitian dan penulisan laporan.
4. Nelfidayani, dkk yang telah menyediakan foto-foto liposom sebagai elemen vital lain dalam penelitian ini.

5. Terima kasih kepada keluarga saya: Rene Johannes, Maria Fatima Lucia, Maria Felicitas Yulinsia, Maria Fabiana Junlistya dan Renato Franklin Johannes atas dukungan materil dan, terutama, moril sehingga penulis mencapai jenjang pendidikan yang sekarang ini.
6. Oma dan opa yang selalu berdoa bagi penulis dan menantikan untuk dapat hadir dalam pelantikan penulis sebagai dokter.
7. Para sahabat yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
8. Kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu selama penelitian berlangsung.

Penulis berharap agar Tuhan Yang Maha Kuasa saja lah yang membalas budi baik yang telah diberikan kepada penulis dan selalu melimpahkan rahmatNya.

Penulis menyadari bahwa dalam penyajian skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karenanya penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun dengan tangan terbuka sehingga nantinya menjadi bahan pelajaran bagi penulis dan dorongan untuk menulis karya ilmiah selanjutnya.

Akhir kata, semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan pembaca pada umumnya.

Jakarta, 22 Juni 2009

Maria Florencia Deslivia

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Maria Florencia Deslivia

NPM : 0105001057

Program Studi : Pendidikan Dokter Umum

Fakultas : Kedokteran

Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif (*Non-Exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul: ” Perbandingan Pengaruh Larutan NaCl dan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 Terhadap Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi” beserta perangkat yang ada (bila diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (*database*), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasi-kannya di Internet atau media lain untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta. Segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah ini menjadi tanggung jawab saya pribadi.

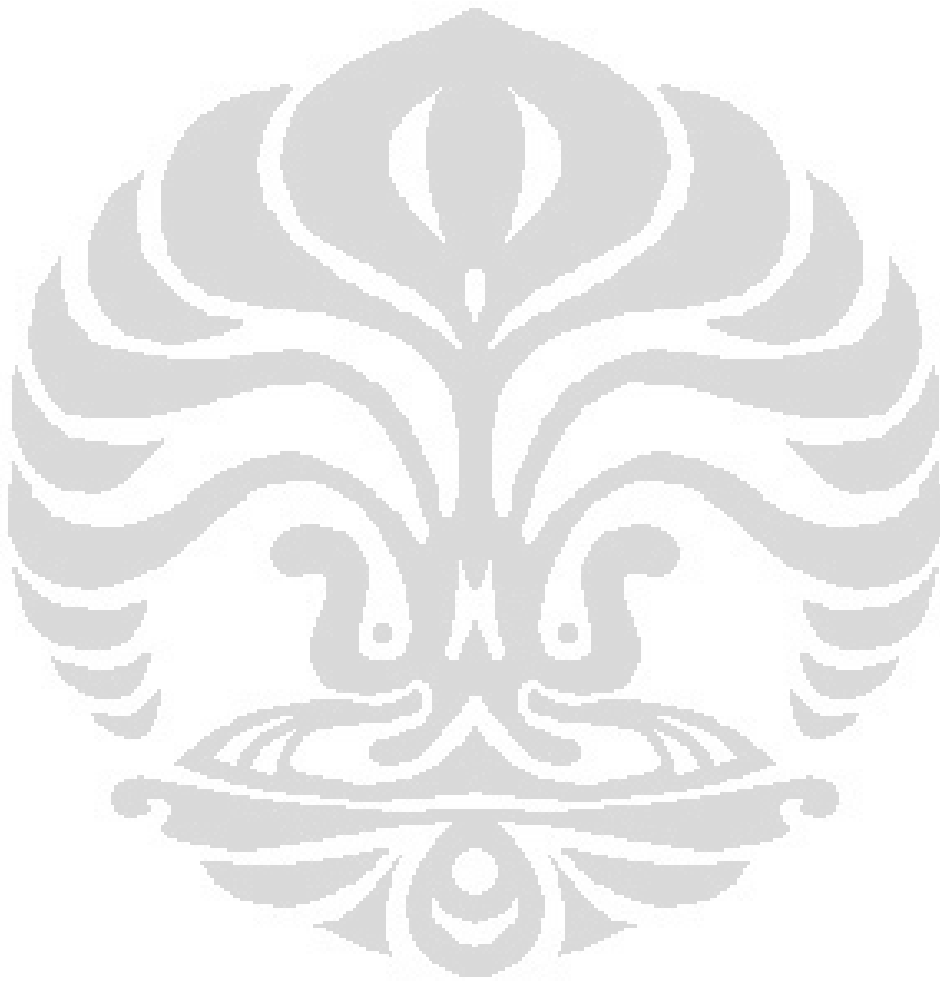
Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 22 Juni 2009

Yang menyatakan,

Maria Florencia Deslivia



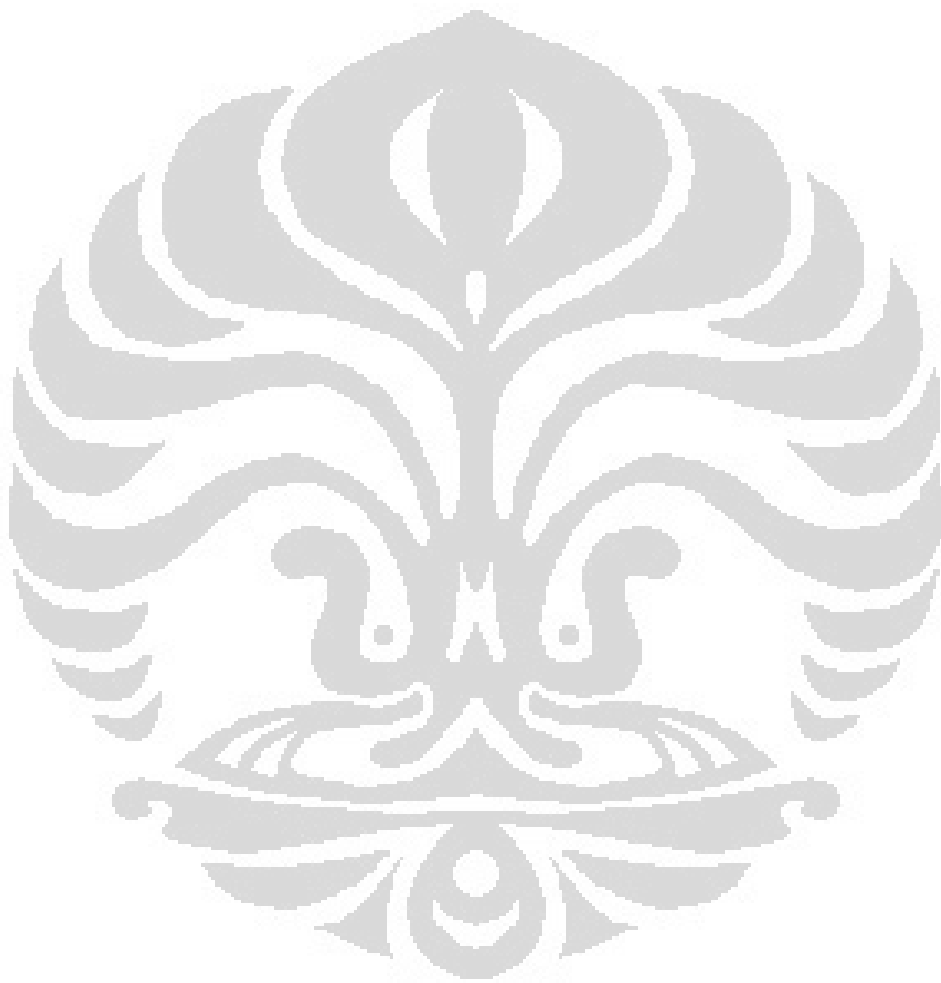
ABSTRAK

Nama : Maria Florencia Deslivia
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum
Pembimbing : Dr. dr. Ernie H. Purwaningsih, MS
Judul : Perbandingan Pengaruh Larutan NaCl dan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 terhadap Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi

Liposom adalah pembawa obat (*drug carrier*), yaitu sediaan yang berfungsi mempermudah obat mencapai reseptor sasaran pada suatu organ atau sel. Kombinasi beberapa lipid dapat digunakan untuk menambah kestabilan liposom, salah satunya adalah liposom formulasi baru yang dibuat dari kombinasi lesitin kuning telur (*Egg yolk Phosphatidyl Choline / EPC*) dan Tetraeter Lipid (TEL) 2,5 mol% dari *Thermoplasma acidophilum* yang kemudian dinamakan sebagai liposom EPC-TEL 2,5. Sebagai pembawa obat, liposom harus stabil secara fisik, kimia maupun biologi agar dapat mengantarkan obat sampai ke sasaran. Stabilitas liposom secara kimia dibuktikan dengan melakukan pemaparan garam-garam fisiologis yang merupakan komponen utama dalam tubuh, seperti Na⁺, Ca²⁺, dan Cl⁻ dengan parameter stabilitas berupa tidak adanya pertambahan diameter liposom. Tujuan penelitian ini adalah membandingkan diameter liposom EPC-TEL 2,5 setelah terpapar larutan NaCl dan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 selama 90 hari pada suhu 4° C. Dalam penelitian ini akan dilakukan pengukuran menggunakan program komputer *Image Pro Plus* terhadap diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam foto-foto yang diambil pada hari ke-1 dan hari ke-90 penyimpanan. Hasil uji menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara diameter liposom pada hari ke-1 dan hari ke-90 penyimpanan dalam larutan NaCl 150 mOsmol pH 5 (p=0,003), ataupun dalam larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 (p=0,000). Namun, tidak terdapat perbedaan bermakna pada diameter liposom hari ke-90 antara penyimpanan dalam larutan NaCl dengan larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 (p=0,967).

Kata kunci:

liposom EPC-TEL 2,5, larutan NaCl 150 mOsmol, larutan CaCl₂ 150 mOsmol, pH 5



ABSTRACT

Name : Maria Florencia Deslivia
Study Programme : S1 General Medicine
Tutor : Dr. dr. Ernie H. Purwaningsih, MS
Title : Comparison of the Effects of Solution of NaCl and CaCl₂ 150 mOsmol at pH 5 on Liposome EPC-TEL 2,5 after Sonication

Liposome is a drug carrier, which is used to facilitate drug to reach organ or cell target,. Liposome can be made from many kinds of lipid. One of the lipid combinations which can be used to increase liposome's stability is a new liposome formulation made from lecithin or Egg yolk Phosphatidyl Choline (EPC) and 2,5 mol% Tetraether Lipid (TEL) from Thermoplasma acidophilum, named liposome EPC-TEL 2,5. As a drug carrier, liposome must have physical, chemical, and biological stability. Chemical stability can be proved by exposing liposome to physiological salts which are the main components in the body, such as Na⁺, Ca²⁺ dan Cl⁻. The stability parameter is the absence of increase in liposome diameter measured with Image Pro Plus. The objective of this study is to compare the effect of solution of NaCl and CaCl₂ 150 mOsmol at the pH 5 on Liposom EPC-TEL 2,5 after Sonication during 90 days storage at temperature of 4° C. In this study, we measured the diameter of liposomes EPC-TEL 2,5 with sonication in photos taken in the first and the 90th day of storage using a computer programme, named Image Pro Plus. The results of these tests showed that there were significant differences of diameter of liposomes in the first and 90th day of storage in solution of NaCl (p=0,003) and CaCl₂ 150 mOsmol at pH 5 (p=0,000). On the other side, there was no significant difference of diameter of liposomes after exposed to solution of NaCl compared to CaCl₂ 150 mOsmol at pH 5 in the 90th day (p=0,967).

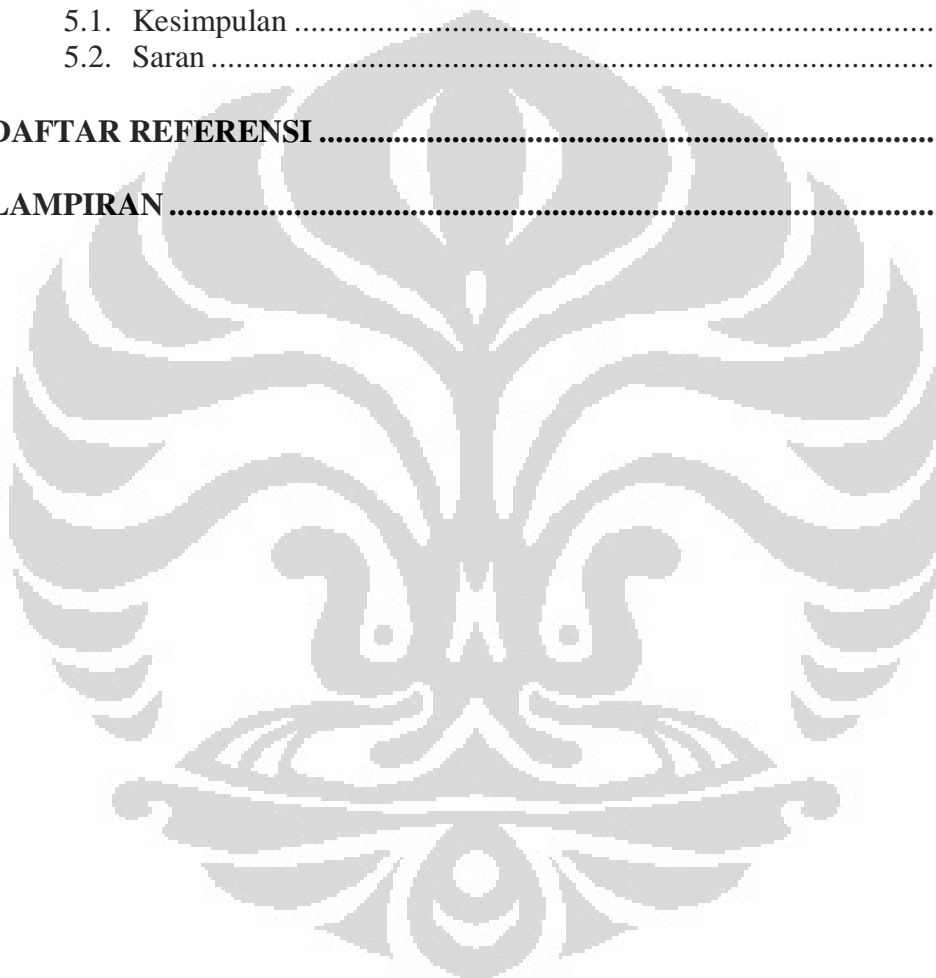
Keywords:

liposome EPC-TEL 2,5, solution of NaCl 150 mOsmol, solution of CaCl₂ 150 mOsmol, pH 5

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	
KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Hipotesis	4
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Liposom	6
2.1.1. Membran Biologis	6
2.1.2. Komponen Penyusun Liposom.....	8
2.1.3. Struktur Fisik Liposom	11
2.2. Garam Fisiologis	12
2.2.1. Kalsium Klorida (CaCl ₂)	12
2.2.2. Natrium Klorida (NaCl)	13
2.3. Pengukuran Diameter Liposom	14
2.4 Kerangka Konsep.....	16
3. METODE PENELITIAN	17
3.1. Desain Penelitian	17
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.3. Bahan dan Alat	17
3.3.1 Bahan	17
3.3.2 Alat	18
3.4. Besar Sampel.....	18

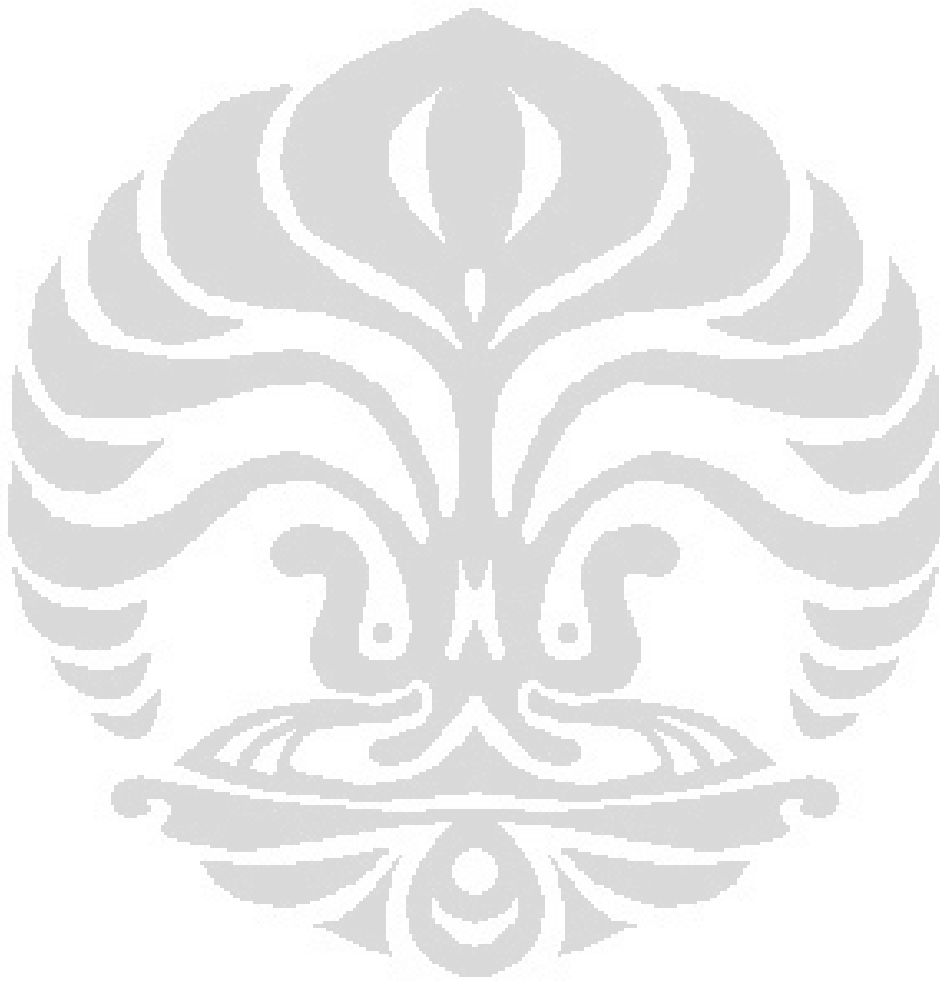
3.5. Cara Kerja	19
3.5.1 Kalibrasi	19
3.5.2 Pengukuran Diameter Liposom	20
3.6. Identifikasi Variabel	21
3.7. Analisis Data.....	22
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1. Hasil Penelitian	23
4.2. Pembahasan Hasil.....	29
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
5.1. Kesimpulan	34
5.2. Saran	34
DAFTAR REFERENSI.....	35
LAMPIRAN	39



DAFTAR GAMBAR

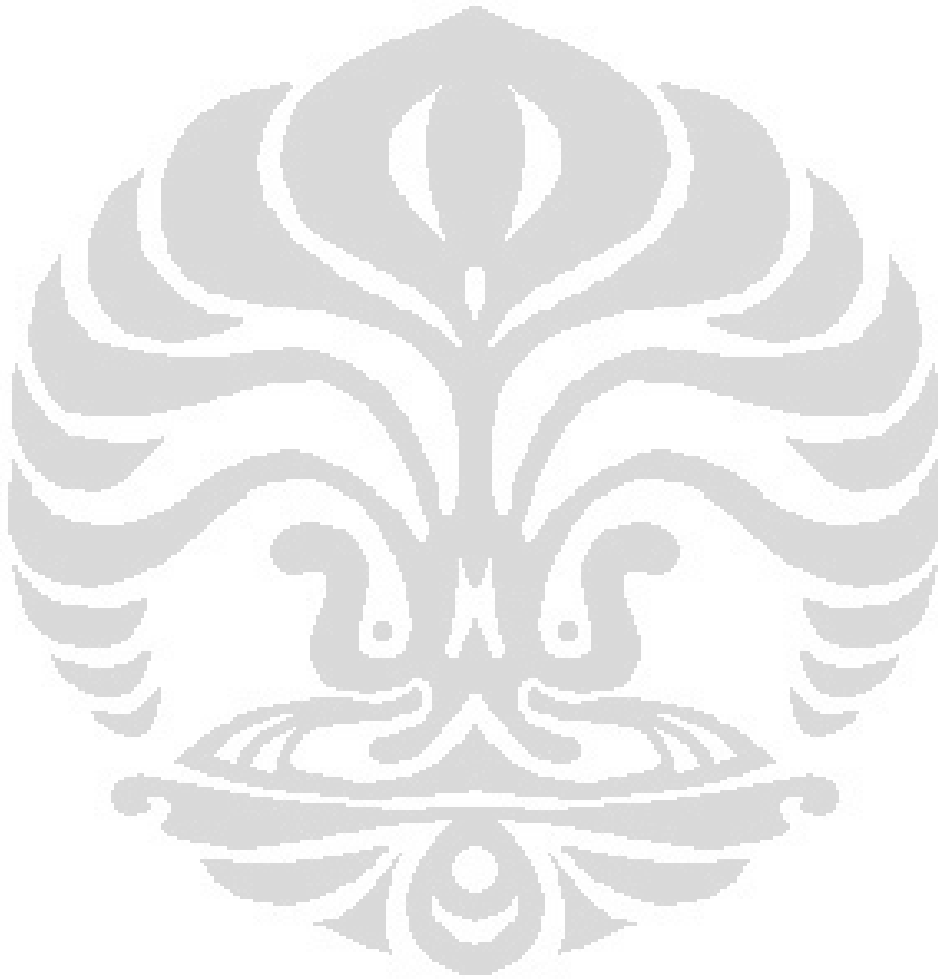
Gambar 1.1. Struktur Liposom	1
Gambar 2.1. Struktur Membran Plasma dan Komponennya	7
Gambar 2.2. Perbandingan Struktur Membran Sel Archae dengan Bakteri Lain	10
Gambar 2.3. Struktur CaCl_2	12
Gambar 2.4. Struktur NaCl	13
Gambar 2.5. <i>Particle Sizer</i>	15
Gambar 3.1. Cara Pengukuran Lebar Kamar Hitung pada Skala Olympus dengan Pembesaran Dua Kali	20
Gambar 3.2. Cara Pengukuran Diameter Liposom pada Skala Olympus dengan Pembesaran Dua Kali	21
Gambar 4.1. Liposom Kontrol Hari Ke-1	23
Gambar 4.2. Liposom Kontrol Hari ke-90	24
Gambar 4.3. Liposom dalam NaCl Hari Ke-1	24
Gambar 4.4. Liposom dalam NaCl Hari Ke-90	24
Gambar 4.5. Liposom dalam CaCl_2 Hari Ke-1	25

Gambar 4.6. Liposom dalam CaCl_2 Hari Ke-90
25



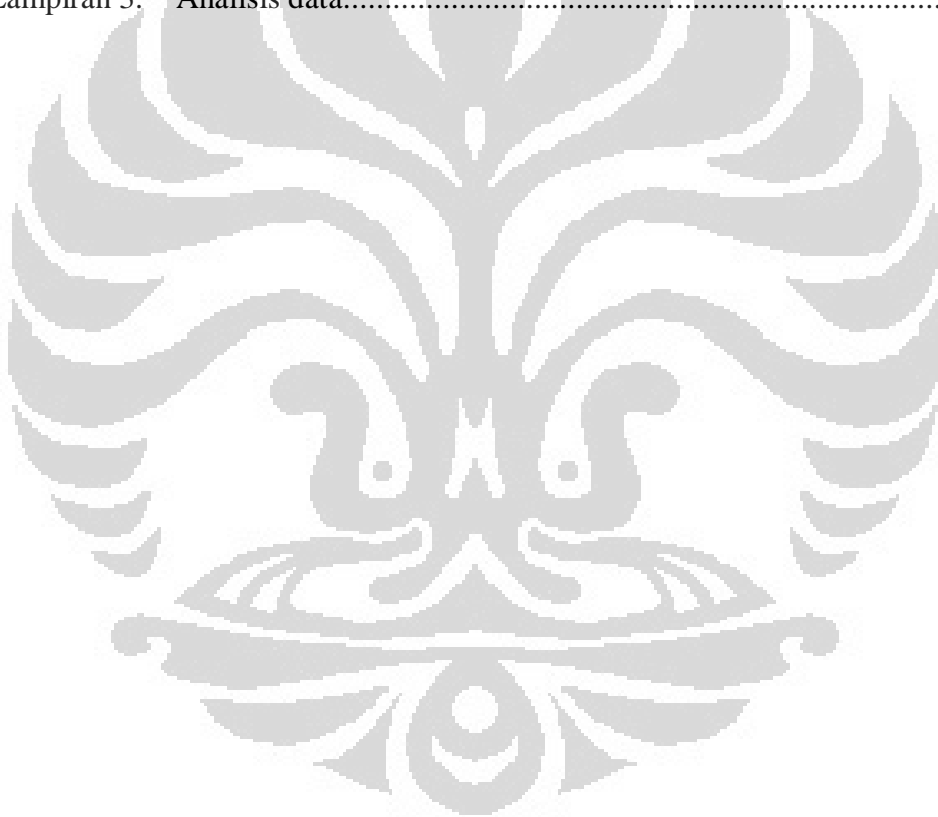
DAFTAR TABEL

- Tabel 4.1. Hasil Rerata Pengukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 pada
Berbagai Perlakuan dengan program *Image Pro Express*.....
26
- Tabel 4.2. Hasil Analisis *post hoc* terhadap Enam Kelompok Perlakuan
27



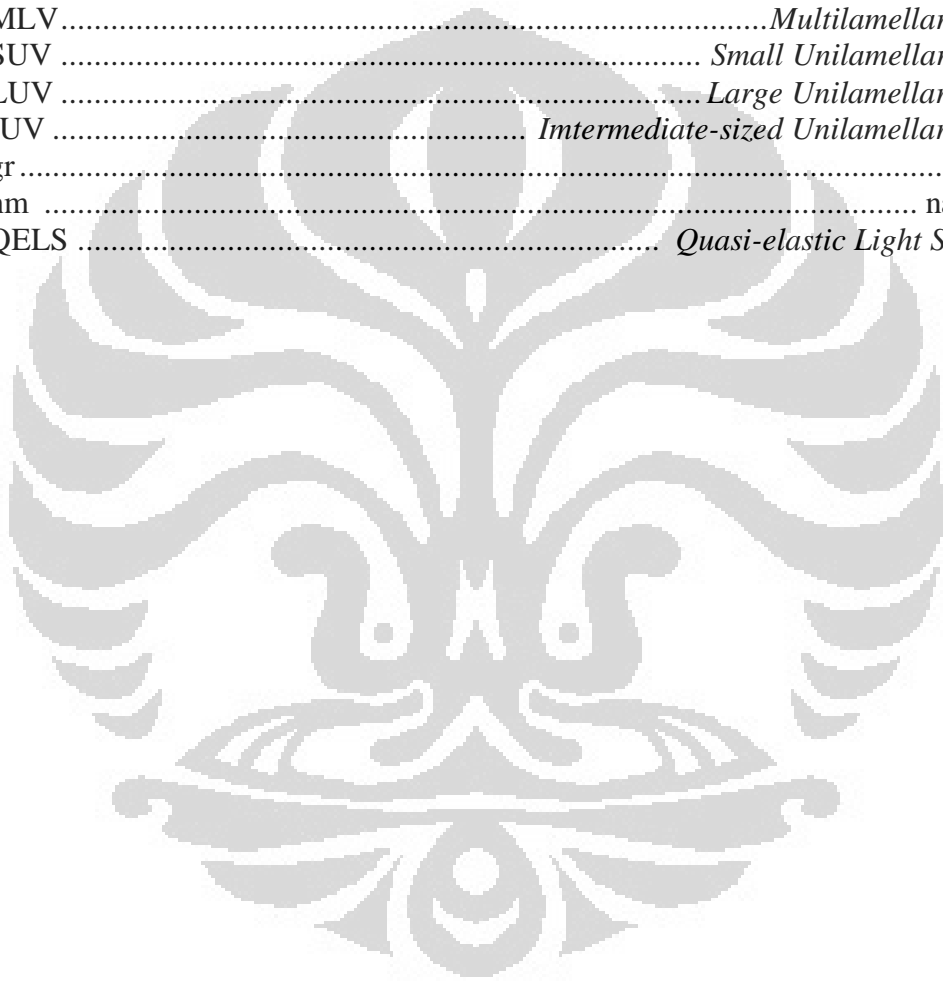
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi.....	39
Lampiran 2. Hasil Pengukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi dengan Program Image Pro Express	43
Lampiran 3. Analisis data.....	46



DAFTAR SINGKATAN

Da.....	Dalton
EPC.....	<i>Egg Yolk Phosphatidyl Choline</i>
TEL.....	Tetraeter Lipid
NaCl.....	<i>Natrium Chloride</i>
CaCl ₂	<i>Calcium Chloride</i>
dkk.....	dan kawan-kawan
MLV.....	<i>Multilamellar Vesicles</i>
SUV.....	<i>Small Unilamellar Vesicles</i>
LUV.....	<i>Large Unilamellar Vesicles</i>
IUV.....	<i>Imtermediate-sized Unilamellar Vesicles</i>
gr.....	gram
nm.....	nanometer
QELS.....	<i>Quasi-elastic Light Scattering</i>

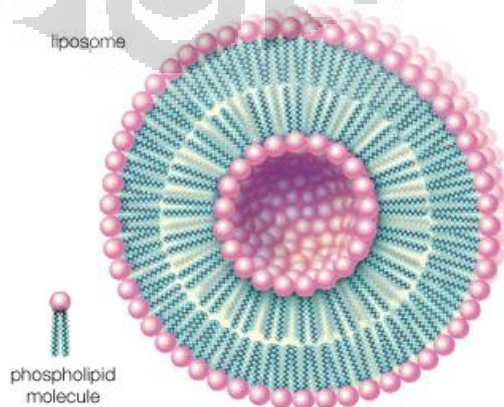


BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Salah satu teknologi dalam bidang farmasi yang tengah pesat dikembangkan saat ini adalah pembawa obat (*drug-carrier*). Pembawa obat merupakan sediaan yang berfungsi mempermudah obat mencapai reseptor sasaran pada suatu organ atau sel.¹ Terdapat tiga masalah utama yang melatarbelakangi pentingnya penggunaan pembawa obat: **pertama** adalah tingginya dosis obat yang digunakan untuk penyakit tertentu, misalnya *Systemic Lupus Erythematosus*, arthritis reumatik, atau kanker, sehingga meningkatkan kemungkinan efek samping, **kedua** adalah pemberian obat secara sistemik yang dapat mempengaruhi organ sensitif seperti hepar, jantung, dan limpa (efek obat yang tidak diinginkan), **ketiga** adalah tingginya frekuensi pemberian obat maupun cara pemberian yang tidak nyaman sehingga berakibat pada ketidakpatuhan pasien.

Pembawa obat yang baik harus memenuhi beberapa kriteria, yaitu bersifat biokompatibel serta mudah didegradasi di dalam tubuh (biodegradabel), tidak toksik, tidak mutagenik serta tidak bersifat imunogenik bagi sel maupun organ. Protein merupakan pembawa obat yang memenuhi syarat tidak toksik serta tidak mutagenik, namun seringkali bersifat imunogenik bila beratnya lebih dari 6.000 Da. Oleh karena itu, pembawa obat yang dipilih dalam penelitian ini adalah liposom.^{2,3}



© 2007 Encyclopædia Britannica, Inc.

Gambar 1.1. Struktur Liposom

(Sumber: Anonim. Diunduh dari: www.brittanica.com, 27 Februari 2009)

Sebagai pembawa obat, liposom telah dipatenkan di Jerman pada tahun 1943 berupa campuran cair antara lesitin dan kolesterol. Namun struktur dan kegunaan liposom baru ditemukan oleh Alec Bangham dari Cambridge pada awal tahun 1960.⁴⁻⁵ Liposom merupakan vesikel sederhana di mana inti air seluruhnya diselubungi oleh membran yang terdiri dari molekul lipid. Struktur maupun fungsi liposom menyerupai membran biologis yang berupa dwilapis lipid.⁶ Umumnya liposom terdiri atas fosfatidil kolin, walau dapat juga mengandung fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, sfingomielin, kolesterol dan lipid lain dengan atau tanpa bahan lain sebagai stabilisator membran.^{6,7}

Pada penelitian ini digunakan liposom formulasi baru yaitu liposom EPC-TEL 2,5. Liposom EPC-TEL 2,5 menggunakan kombinasi fosfolipid berupa fosfatidilkolin kuning telur (*Egg Yolk Phosphatidyl Choline* / EPC) serta Tetraeter Lipid (TEL) dari *Thermoplasma acidophilum* dengan kadar 2,5 mol%.⁸ Fosfolipid memiliki kepala yang bersifat polar dan mengandung gugus fosfat bermuatan negatif serta dua ekor asam lemak nonpolar. Ujung polar bersifat hidrofilik sedangkan ujung nonpolar bersifat hidrofobik. Molekul-molekul ini nantinya akan menyusun dwilapis lipid saat bersentuhan dengan air.⁹ Agar dapat bersirkulasi dalam waktu lama, membran biologis ini memerlukan stabilisator, yaitu TEL.¹⁰⁻¹²

Sebagai pembawa obat, liposom diharuskan memiliki stabilitas secara fisik, kimia, maupun biologi agar dapat mengantarkan obat sampai ke sasaran. Stabilitas liposom secara kimia dibuktikan dengan melakukan pemaparan garam-garam fisiologis yang merupakan komponen utama dalam tubuh, seperti Na^+ , Ca^{2+} , dan Cl^- . Selain itu, dinilai pula bagaimana pengaruh gradien osmotik dan keasaman tertentu terhadap stabilitas liposom. Parameter stabilitas yang dimaksud adalah tidak adanya penambahan diameter liposom pada pengukuran.

Untuk menguji stabilitas sebuah sistem terdispersi, uji standar yang dilakukan

adalah dengan cara memaparkannya pada kekuatan ionik tinggi. Uji ini dapat dilakukan menggunakan garam seperti NaCl atau CaCl₂. Pada sistem biologis, ion kalsium dapat menjadi tantangan yang lebih besar daripada kekuatan ionik tinggi karena ion kalsium cenderung melakukan adsorpsi pada permukaan terkarboksilasi secara spesifik. Ditemukan pula bahwa inkorporasi kolesterol menstabilkan liposom terhadap ion kalsium.¹³

Saat ini, teknik terbaik dalam mengukur diameter liposom adalah dengan menggunakan *particle sizer*.¹⁴ Banyak penelitian menggunakan *particle sizer* dengan teknik *quasi-elastic laser light scattering* (QELS) untuk menentukan ukuran liposom maupun *polydispersity index* (PDI).^{13,15-16} Kelebihan *particle sizer* adalah kemampuannya menentukan diameter rata-rata serta distribusi liposom; sedangkan kekurangannya adalah harga yang sangat mahal.¹⁴

Selain *particle sizer*, ternyata ada pula program bernama *Image Pro Plus* yang pada awalnya digunakan untuk mengukur citra ilmiah semacam sel maupun partikel-partikel lain.^{17,18} Program ini belum pernah digunakan oleh penelitian untuk mengukur diameter liposom. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan pengukuran diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi setelah liposom tersebut terpajan larutan NaCl dan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 menggunakan program komputer *Image Pro Express*, salah satu macam dari program *Image Pro Plus*. Bahan yang digunakan berupa foto liposom EPC-TEL 2,5 yang terpajan larutan NaCl dan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 hasil penelitian Nelfidayani dkk.¹⁹ Diameter liposom hasil pengukuran yang dipengaruhi oleh kedua garam tersebut akan dibandingkan dengan kontrol dan dianalisis secara statistik.

1.2. Rumusan Masalah

Teknik pengukuran yang digunakan oleh para ahli untuk menentukan diameter liposom sejauh ini adalah *particle sizer*. Walaupun banyak memiliki kelebihan, alat tersebut memiliki harga yang sangat mahal. Di sisi lain, telah dikembangkan

sebuah program komputer yang mampu mengukur sel atau partikel lain dengan cukup akurat. Program ini belum pernah dimanfaatkan dalam pengukuran diameter liposom.

Berdasarkan uraian tersebut, dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

- a. Apakah liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi tidak mengalami perubahan diameter setelah pemaparan garam NaCl 150 mOsmol pH 5 hingga penyimpanan hari ke-90 dalam suhu 4° C?
- b. Apakah liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi tidak mengalami perubahan diameter setelah pemaparan garam CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 hingga penyimpanan hari ke-90 dalam suhu 4° C?
- c. Apakah terdapat perbedaan diameter antara liposom dengan paparan NaCl dibandingkan dengan liposom dengan paparan CaCl₂ 150 mOsmol pada pH 5 hingga penyimpanan hari ke-90?

1.3. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah:

- a. Tidak terdapat perbedaan antara nilai ukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 dengan paparan NaCl 150 mOsmol pH 5 selama masa penyimpanan 90 hari pada suhu 4° C dibandingkan kontrol.
- b. Tidak terdapat perbedaan antara nilai ukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 dengan paparan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 selama masa penyimpanan 90 hari pada suhu 4° C dibandingkan kontrol.
- c. Tidak terdapat perbedaan antara nilai ukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 dengan paparan NaCl dibandingkan paparan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 selama masa penyimpanan 90 hari pada suhu 4° C.

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

Tujuan Umum: Mengukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi pada pemaparan garam NaCl dan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5.

Tujuan Khusus:

- a. Membandingkan diameter liposom EPC-TEL 2,5 setelah terpapar larutan NaCl 150 mOsmol pH 5 selama 90 hari pada suhu 4° C dengan kondisi awal dan metode pengukuran menggunakan program komputer *Image Pro Plus*.
- b. Membandingkan diameter liposom EPC-TEL 2,5 setelah terpapar larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 selama 90 hari pada suhu 4° C dengan kondisi awal dan metode pengukuran menggunakan program komputer *Image Pro Plus*.
- c. Membandingkan diameter liposom EPC-TEL 2,5 setelah terpapar larutan NaCl dan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 selama 90 hari pada suhu 4° C.

1.5. Manfaat Penelitian

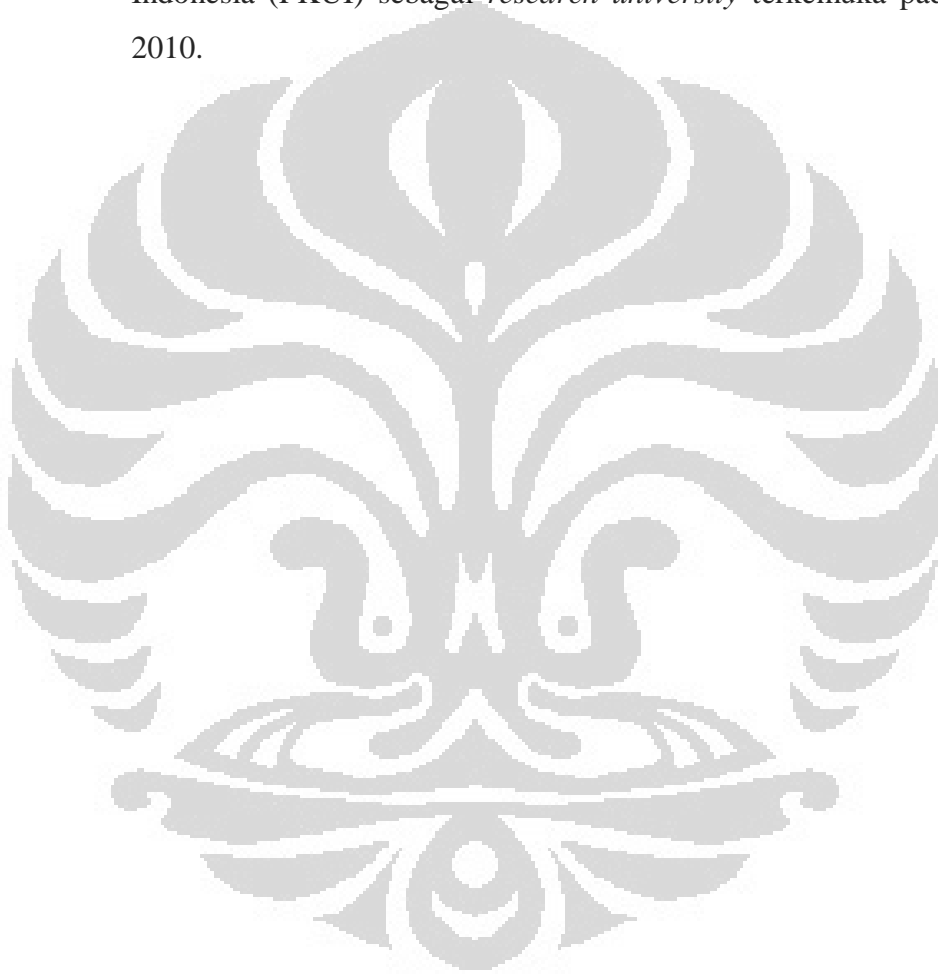
Manfaat dari penelitian ini dalam bidang ilmiah adalah:

- a. Memperkenalkan program komputer *Image Pro Plus* sebagai salah satu alternatif metode pengukuran diameter liposom yang relatif lebih praktis dan ekonomis, sehingga semakin merangsang munculnya minat melakukan penelitian-penelitian baru mengenai liposom.
- b. Mempelajari pengaruh lingkungan dalam tubuh manusia, seperti ion-ion serta pengaruh kondisi pH tubuh manusia, terhadap diameter liposom sebagai pembawa obat yang akhirnya berperan dalam hal stabilitas liposom secara kimiawi.

Manfaat dari penelitian ini bagi perguruan tinggi adalah:

- a. Pengejawantahan tridarma perguruan tinggi sebagai lembaga penyelenggara pendidikan, penelitian, dan pengabdian bagi masyarakat.

- b. Sebagai sumbangan dalam mengkaji pengaruh larutan NaCl dan larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 terhadap diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi.
- c. Meningkatkan hubungan kerjasama dan saling pengertian antara pendidik dan mahasiswa.
- d. Meningkatkan kualitas penelitian perguruan tinggi dalam rangka mensukseskan pencapaian visi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI) sebagai *research university* terkemuka pada tahun 2010.



BAB 2 **TINJAUAN PUSTAKA**

2.1 Liposom

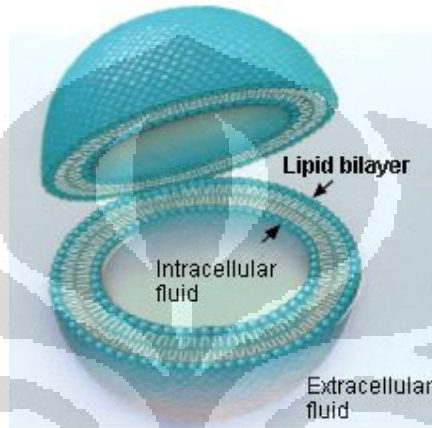
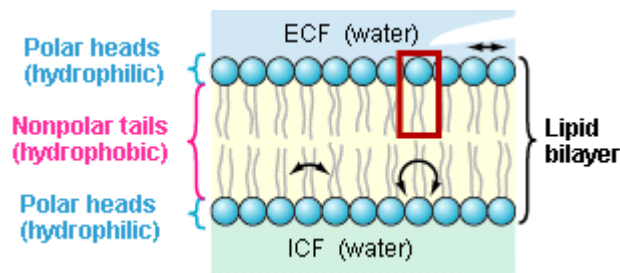
Liposom merupakan vesikel sederhana dengan struktur serupa membran plasma, yaitu molekul lipid yang menyelubungi inti air.^{2,6,20-24} Sifatnya yang menyerupai membran biologis membuat liposom dapat didegradasi dengan jalur yang sama dengan membran sel. Oleh karena itu liposom sangat aman dan dapat menjadi pembawa obat yang efektif untuk aplikasi medis.²²

2.1.1 Membran Biologis

Membran plasma setiap sel terutama terdiri atas lipid, protein, dan sejumlah kecil karbohidrat. Lipid adalah biomolekul tak larut air yang dapat larut dengan baik dalam pelarut organik seperti kloroform.²⁰ Lipid membran yang paling banyak dijumpai adalah fosfolipid, dengan kolesterol dalam jumlah yang lebih sedikit. Fosfolipid memiliki kepala yang bersifat polar (memiliki muatan listrik) karena mengandung gugus fosfat bermuatan negatif serta ekor berupa asam lemak yang bersifat nonpolar (muatan listriknya netral). Ujung polar ini hidrofilik (“suka air”) karena dapat berinteraksi dengan molekul air, yang juga polar; sedangkan ujung nonpolar bersifat hidrofobik (“takut air”) dan tidak dapat bercampur dengan air. Molekul ini dapat menyusun diri menjadi dwilapis lipid ketika berkontak dengan air. Ekor yang hidrofobik menjauhkan diri dari air dan berjajar di bagian pusat sedangkan kepala hidrofilik berjajar pada kedua permukaan yang bersentuhan dengan air.^{6,20-21}

Kolesterol turut berperan terhadap fluiditas dan stabilitas membran.²⁰⁻²² Kolesterol mengandung inti steroid pemenuh ruang dengan gugus hidroksil pada satu sisi dan ekor hidrokarbon yang lentur pada sisi lain. Kolesterol tersisip dalam dwilapis dengan sumbu panjang tegak lurus pada bidang membran. Kolesterol mencegah kristalisasi rantai-rantai asam lemak dengan meyusup di antaranya. Pada dasarnya, konsentrasi kolesterol yang tinggi dapat menghapus fase peralihan

dwilapis.²⁰ Dengan demikian, kolesterol meredam fluiditas membran.²⁰⁻²²



Gambar 2.1. Struktur Membran Plasma dan Komponennya

(Sumber: Sherwood L. *Human Physiology*. Thomson Learning 2004.)

Membran sangat beragam, baik dari segi struktur maupun fungsi. Namun secara singkat dapat disimpulkan bahwa terdapat kesamaan dalam sejumlah faktor penting, yaitu:²⁰⁻²¹

- a. Membran berwujud lembaran yang, dengan ketebalan hanya beberapa molekul, membentuk batas lingkup ruang antara dua kompartemen yang berlainan. Kebanyakan membran tebalnya antara 60 Å (6 nm) dan 100 Å (10 nm).
- b. Membran terdiri terutama atas lipid dan protein dengan perbandingan massa berkisar antara 1:4 dan 4:1. Membran juga mengandung karbohidrat yang terikat pada lipid dan pada protein.
- c. Lipid membran merupakan molekul relatif kecil yang mengandung fragmen, baik hidrofil, maupun hidrofob. Dalam lingkungan air, molekul-molekul lipid ini secara spontan tersusun sebagai lembaran dwilapis lipid yang rapat. Dwilapis lipid ini berperan sebagai sawar penghambat aliran

molekul yang bersifat polar.

- d. Berbagai fungsi khas membran terlaksana melalui protein-protein spesifik. Protein dapat berperan sebagai pompa, saluran, reseptor, pembangkit energi, enzim. Protein membran terpendam dalam dwilapis lipid, lingkungan yang cocok untuk melaksanakan fungsinya.
- e. Membran merupakan rakitan nonkovalen. Molekul-molekul protein dan lipid yang menyatu digabungkan oleh banyak interaksi nonkovalen yang saling menunjang.
- f. Membran bersifat asimetris. Salah satu jenis asimetri yang terjadi disebabkan penempatan fosfolipid. Fosfolipid yang mengandung kolin (fosfatidilkolin dan sfingomielin) terletak terutama pada lapisan luar molekul; sedangkan aminofosfolipid (fosfatidilserin dan fosfatidiletanolamin) terletak pada bagian dalam.
- g. Membran merupakan susunan cair. Molekul-molekul lipid berdifusi dengan cepat dalam lembaran membran, demikian juga protein, kecuali bila terjangkar dalam membran akibat berbagai interaksi tertentu. Walaupun demikian, tidak ada yang tergulir menerobos membran. Membran dapat dianggap sebagai larutan dua dimensi yang terdiri atas protein dan lipid yang terarah.
- h. Kebanyakan membran berpolarisasi listrik, dengan muatan negatif di bagian dalam (biasanya -60 milivolt). Potensial membran memegang peran kunci pada transport, konversi energi dan daya rangsang.

2.1.2 Komponen Penyusun Liposom

Liposom merupakan rongga berisi air yang dibatasi oleh dwilapis lipid dan dibuat dengan cara membentuk suspensi lipid tertentu, misalnya fosfatidil kolin, dalam lingkungan air.^{20-21,25} Struktur dan kegunaan liposom ini ditemukan pertama kali oleh Alec Bangham dari Cambridge pada awal tahun 1960. Sejak itu, penggunaan liposom mulai banyak diimplementasikan dalam bidang biologi, biokimia maupun kedokteran modern.²²

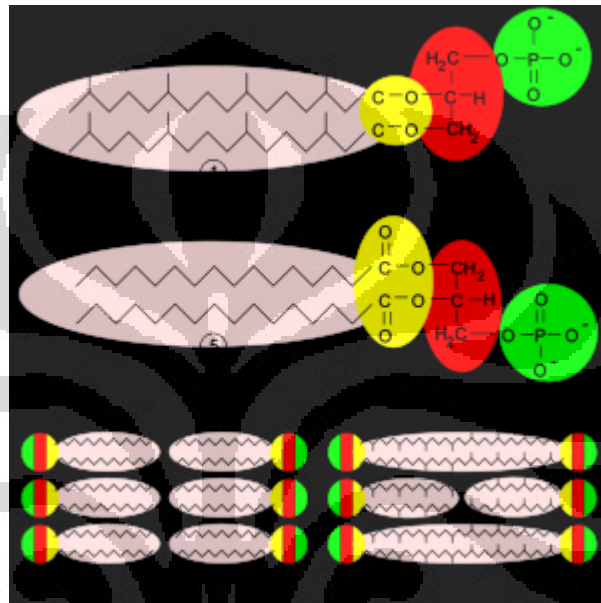
Komponen utama yang digunakan untuk membentuk liposom adalah fosfolipid. Fosfolipid merupakan jenis lipid yang dapat membentuk lapis ganda sehingga menyerupai lapis lipid ganda pada membran biologis.^{2,6,22-26} Fosfolipid sebagai komponen struktural membran biologis terdiri atas fosfatidilkolin, fosfatidilserin, dan fosfatidilinositol. Fosfolipid yang terutama lazim digunakan pada pembuatan liposom konvensional adalah fosfatidilkolin, yang disebut juga lesitin.^{2, 21}

Fosfatidilkolin adalah molekul amfifatik yang memiliki jembatan gliserol sebagai penghubung sepasang rantai asil hidrokarbon hidrofobik, dengan kepala polar hidrofilik yaitu fosfokolin. Fosfatidilkolin (lesitin) bisa dibentuk baik dari sumber alami maupun sintetik. Fosfatidilkolin alami dapat diambil dari kuning telur (*Egg-yolk Phosphatidylcholine* = EPC), kedelai (*Soy-bean Phosphatidylcholine* = SPC), maupun, yang lebih jarang, berasal dari jantung sapi dan korda spinalis.^{2,21} Molekul ini akan bersifat sebagai *ion zwitter* dalam semua pH yang relevan sehingga dapat membentuk struktur lamelar yang independen terhadap pH suatu larutan.²⁵ Oleh karena fosfatidilkolin merupakan komponen fosfolipid utama membran sel dengan harga relatif rendah dibanding fosfolipid lain serta bermuatan netral, maka fosfatidilkolin dijadikan komponen utama liposom yang digunakan secara luas.^{22,25} Selain itu, dapat pula ditambahkan kolesterol untuk memperbaiki stabilitas mekanis serta menurunkan kebocoran senyawa aktif melalui membran.⁶

Lipid lain yang sedang dikembangkan sebagai stabilisator membran liposom adalah Tetraeter Lipid (TEL) dari membran sel Archaea, yaitu antara lain *Thermoplasma acidophilum* dan *Sulfolobus acidocaldarius*. TEL yang berasal dari *Thermoplasma acidophilum* telah teruji tidak toksik dan tidak bersifat mutagenik atau antimutagenik, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.²⁶⁻²⁷ TEL yang berasal dari *Sulfolobus acidocaldarius* belum teruji toksisitasnya seperti *Thermoplasma acidophilum*.

Thermoplasma acidophilum merupakan *archaebacterium* asidofilik dengan pertumbuhan optimum pada suhu 59° C pada pH 1 hingga 2.¹¹ Liposom dengan

fosfolipid utama dari *Thermoplasma acidophilum* tidak dihancurkan oleh agen oksidasi dan agen hidrolisis seperti asam. Resistensi liposom yang berasal dari fosfolipid utama terhadap keasaman dan impermeabilitas terhadap proton dapat melindungi kandungan yang labil, seperti protein dan peptida, melewati pH asam selama berada di lambung.²⁶⁻²⁷



Gambar 2.2. Perbandingan Struktur Membran Sel Archae dengan Bakteri Lain
Keterangan: **Atas:** membran sel Archae; **tengah:** membran sel bakteri lain;
bawah kiri: dwilapis lipid bakteri lain; **bawah kanan:** dwilapis lipid sel Archae.
(Sumber: De Rosa M, Gambacorta A, Gliozzi A. Microbiol. Rev. 1986;50(1))

Fosfolipid hasil ekstraksi dari membran sel Archae ini berupa eter-glisserol atau derivat poliol lain yang membentuk monolapis lipid. Ikatan eter-glisserol sangat resisten terhadap temperatur yang ekstrim, pH yang sangat asam, maupun pH yang sangat basa sehingga memberi keuntungan lain dibandingkan dengan ikatan ester yang terdapat pada membran bakteri pada umumnya. Ketiadaan ikatan rangkap dalam struktur TEL akan meningkatkan resistensi terhadap oksidasi, sedangkan adanya gugus metil samping akan menambah efek fluiditas. Karena itu, liposom monolapis yang dibentuk oleh TEL dari membran sel Archaea dapat bersifat stabil dengan ikatan yang cukup erat.^{11,23, 28-29} Selain itu, ekor lipid Archae terbuat dari rantai samping isoprenoid dan merupakan rantai panjang

dengan cabang samping multipel serta cincin siklopropan atau sikloheksan. Rantai samping ini membantu mencegah kebocoran membran pada suhu tinggi.³⁰

2.1.3 Struktur Fisik Liposom

Selain komponen kimiawi, yang menentukan fluiditas membran, densitas muatan, dan permeabilitas, liposom juga dapat dicirikan lewat ukuran dan bentuknya. Liposom dapat bervariasi dalam hal ukuran, mulai dari ukuran terkecil (diameter sekitar 25 nm) hingga liposom yang terlihat dengan menggunakan mikroskop cahaya (diameter sekitar 1000 nm atau lebih besar), setara dengan ukuran sel hidup. Liposom dapat terdiri dari membran dwilapis tunggal, atau terdiri dari lamela membran konsentrik yang multipel.³¹

Klasifikasi liposom berdasarkan ukuran adalah yang paling sering digunakan. Hal ini dikarenakan liposom dengan ukuran berbeda mensyaratkan metode pembuatan yang berbeda pula. Selain itu, penggunaan yang berbeda memerlukan liposom dalam rentang ukuran yang berbeda pula. Berikut ini merupakan penggolongan liposom yang paling umum dipakai:³¹

a. *Multilamellar Vesicles (MLV)*.

Biasanya terdiri atas populasi vesikel dengan ukuran antara 100 nm hingga 1000 nm. Setiap vesikel mengandung lima atau lebih lamela konsentrik.

b. *Small Unilamellar Vesicles (SUV)*

Liposom dalam kelompok ini memiliki ukuran terkecil yang memungkinkan bagi sebuah vesikel fosfolipid. Batas ukuran terkecil tersebut bervariasi, tergantung dari kekuatan ionik dari medium cair dan komposisi lipid dari sebuah membran, yaitu sekitar 15 nm untuk lesitin telur murni dalam saline normal, dan 25 nm untuk liposom DPPC.

c. *Large Unilamellar Vesicles (LUV)*

Liposom-liposom tersebut memiliki diameter sekitar 1000 nm.

d. *Intermediate-sized Unilamellar Vesicles (IUV)*

Liposom dalam kelompok ini memiliki diameter di atas 100 nm.

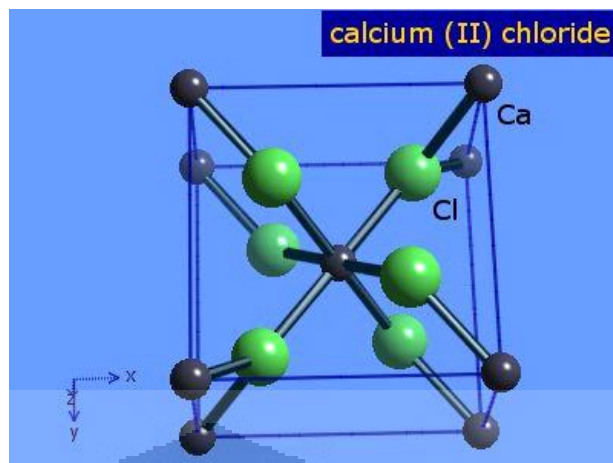
Diameter atau ukuran liposom sangat ditentukan oleh beberapa hal, antara lain:¹

- a. Jenis lipid dan kombinasinya. Sebagai contoh: liposom yang terbuat dari campuran EPC dan kolesterol berdiameter lebih besar (100-200 nm) dibandingkan dengan liposom dari EPC saja (<100 nm).
- b. Keseimbangan antara energi untuk membuka membran liposom, elastisitas kelengkungan liposom, dan jumlah energi yang tersebar.
- c. Cara pembuatan.

Jumlah lapisan membran dan besar ukuran liposom ditentukan oleh cara pembuatannya. Liposom atau vesikel yang dibuat dengan cara dikocok menggunakan tangan akan berbentuk multilamellar dan berukuran besar (MLV). Ukuran liposom tersebut dapat diperkecil menjadi SUV dengan cara mengekstrusikannya melalui membran polikarbonat 100 nm atau dengan cara sonikasi menggunakan probe atau sonikasi di dalam air. Pembuatan liposom dengan cara dialysis terhadap *mixed-micelles* dengan deterjen atau dengan cara *reverse phase evaporation*. *Freeze-thawing sonication*, perubahan pH dan penambahan kalsium akan menghasilkan LUV. Sonikasi terhadap LUV akan menghasilkan SUV. Hasil yang sama diperoleh dengan cara lain yaitu *freeze-thawing*. *French pressure cell* yang bertekanan tinggi dan metode injeksi secara cepat menggunakan etanol dan eter.¹

2.2 Garam Fisiologis

2.2.1. Kalsium Klorida (CaCl₂)



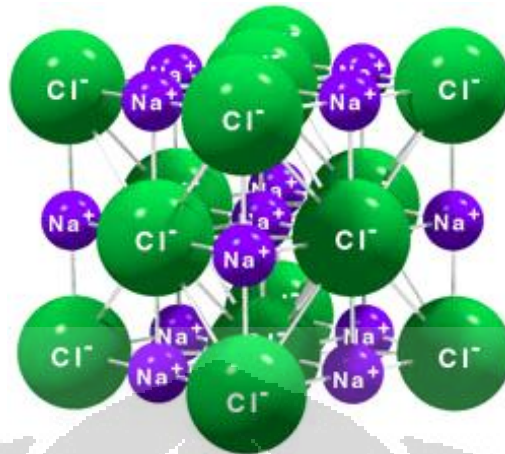
Gambar 2.3. Struktur CaCl_2

(Sumber: Winter M. Diunduh dari: www.webelements.com, 28 Maret 2009)

Kalsium klorida merupakan bahan kimia yang telah banyak diproduksi selama lebih dari seratus tahun. Kalsium klorida memiliki beberapa sifat yang penting. Pertama, senyawa ini bersifat higroskopik sehingga dapat menyerap air dari kelembaban udara atau permukaan. Kedua, kalsium klorida melepaskan panas ketika meleleh (bersifat eksotermik). Ketiga, ketika menyerap air dari kelembaban udara, senyawa ini akan melarut di dalamnya. Sifat keempat adalah dapat meleleh pada suhu yang jauh lebih rendah daripada garam. Terakhir adalah sifatnya yang tahan lama, yaitu dapat mempertahankan kelembaban yang diserap dalam periode waktu yang cukup lama.³²

Selain sebagai komponen utama penyusun tulang, kalsium memiliki beberapa fungsi vital lain di dalam tubuh, yaitu dalam hal komunikasi sel. Kalsium berperan penting dalam memediasi konstiksi dan relaksasi pembuluh darah, transmisi impuls saraf, kontraksi otot, serta sekresi hormon seperti insulin. Sel-sel yang dapat tereksitasi seperti otot rangka dan sel saraf mengandung kanal kalsium *voltage-dependent* pada membran selnya. Selain itu, kalsium juga diperlukan untuk menstabilisasi sejumlah protein dan enzim agar dapat mengoptimalkan aktivitas protein. Sebagai contoh, pengikatan dengan ion kalsium diperlukan untuk mengaktifasi tujuh faktor pembekuan yang bergantung pada vitamin K dalam kaskade koagulasi.³²

2.2.2 Natrium Klorida (NaCl)



Gambar 2.4. Struktur NaCl

(Sumber: Anonim. Diunduh dari: www.commons.wikimedia.org, 28 Maret 2009.)

Natrium klorida merupakan senyawa ionik sederhana yang terdiri dari susunan raksasa ion natrium dan klorida. Natrium klorida disebut juga garam dapur atau *halite*.³³⁻³⁴ Natrium klorida merupakan garam yang paling bertanggung jawab dalam keseimbangan cairan ekstraseluler pada organisme multiseluler. Natrium juga merupakan faktor penting dalam potensial membran sel dan transpor aktif molekul melalui membran sel.³³ Natrium klorida mengandung 60.663% elemen klorin dan 39.337% elemen natrium.³⁴

Natrium dan klorida bergabung dengan menggunakan ikatan ionik dan kekuatan elektrostatik. Dengan ikatan ionik ini, natrium klorida mudah larut dalam air. Natrium klorida merupakan larutan netral karena ionisasinya tidak mempengaruhi konsentrasi lokal ion hidrogen atau hidroksida.³⁴

Ion natrium sangat penting perannya dalam mengatur volume darah, fungsi membran, dan absorpsi air. Peran ion klorin pun serupa dengan ion natrium, yakni fungsi membran, volume darah, dan absorpsi cairan.³⁴ Diperkirakan bahwa hampir 100 gr dari ion natrium atau ekuivalen dengan 250 gr NaCl terkandung di dalam tubuh manusia. Garam natrium merupakan garam yang dapat cepat diserap oleh tubuh dengan jumlah minimum yang dibutuhkan tubuh manusia dewasa berkisar antara 1,3-1,6 gr/hari (ekuivalen dengan 3,3-4,0 gr NaCl/hari).³⁵

2.3 Pengukuran Diameter Liposom

Salah satu cara untuk menentukan stabilitas liposom adalah pengukuran diameter liposom. Diameter liposom dapat dipengaruhi oleh bahan-bahan kimia (seperti NaCl dan CaCl₂), waktu penyimpanan, suhu, dan lain-lain. Teknik pengukuran yang seringkali digunakan dalam berbagai riset liposom adalah *Quasi-elastic Light Scattering* (QELS) dengan alat bernama *particle sizer*.³⁶⁻³⁷ Alat ini dapat mengukur ukuran mikropartikel serta distribusinya dengan baik³⁸⁻⁴⁰, walaupun ternyata juga memiliki kekurangan, yaitu dapat terpengaruh oleh muatan multipel yang berasal dari aglomerasi kotoran berukuran di atas 1000 nm.³⁷ Pengukuran diameter ini pernah dilakukan oleh Nelfidayani dkk¹⁹ dengan cara mengelompokkan liposom yang berukuran kurang atau sama dengan 100 nm dan liposom berukuran lebih dari 100 nm.

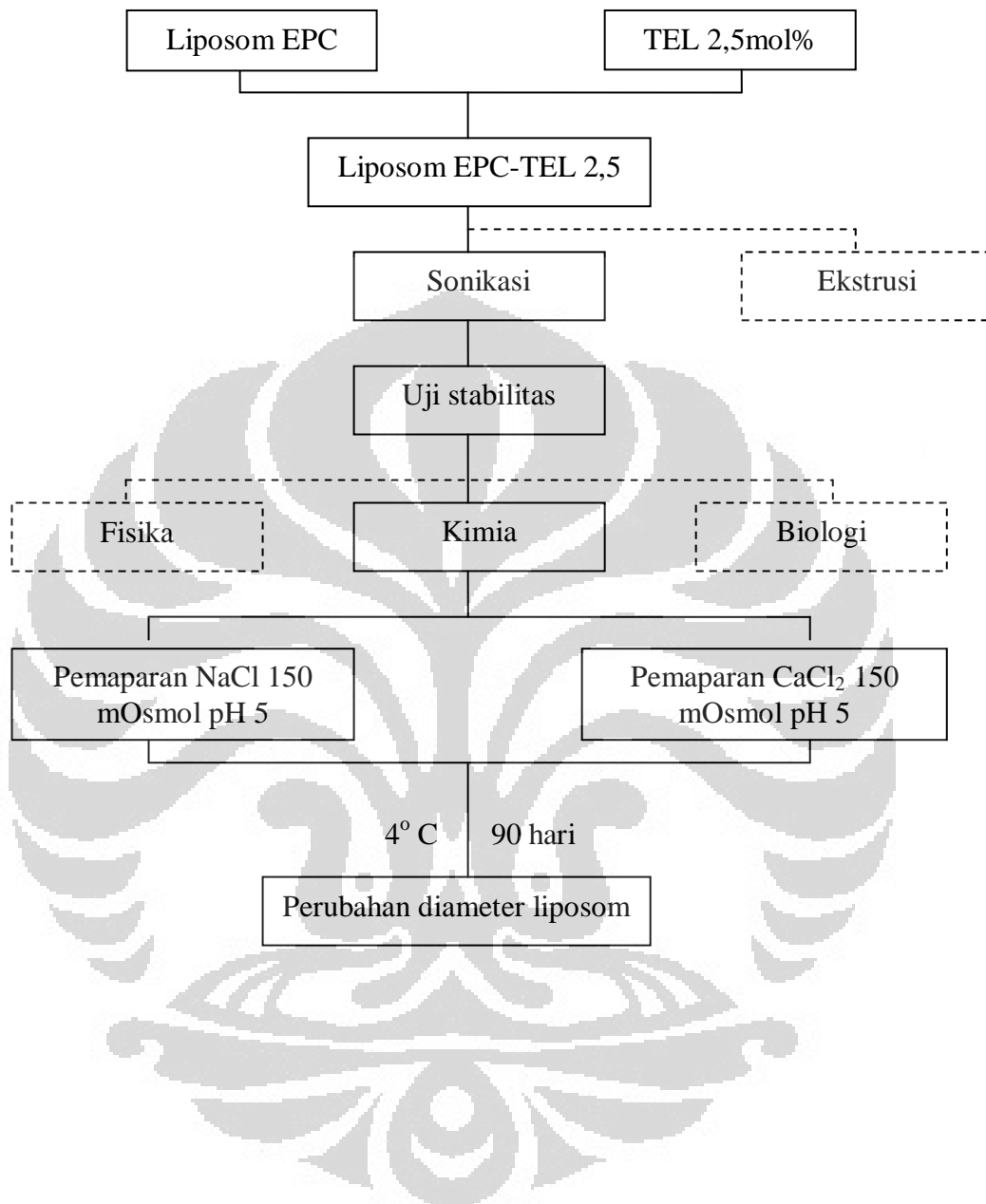


Gambar 2.5. *Particle Sizer*⁴⁰

(Sumber: Anonim. Diunduh dari: www.npl.co.uk, 28 Maret 2009.)

Selain QELS, ada pula program komputer bernama “*Image Pro Plus*” yang dapat digunakan untuk mengukur diameter liposom. Program ini merupakan perangkat halus analisis citra untuk pencitraan fluoresens, pencitraan material dan berbagai aplikasi ilmiah, medis dan industrial lainnya. Kelebihan program ini antara lain adalah kemampuan menganalisis data dengan menggunakan *scattergram*, *histogram* dan *line profiles*.⁴¹ Salah satu macam dari program *Image Pro Plus* adalah program *Image Pro Express*.

2.4 Kerangka Konsep



BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan sebuah studi eksperimental dengan mengukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi yang diberi pemaparan larutan NaCl dan CaCl₂ 150 mOsmol pada pH 5. Pengukuran dilakukan pada hari ke-1 dan hari ke-90.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Departemen Fisika Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia sejak bulan Agustus hingga Oktober 2008. Penelitian terdiri dari pengumpulan data penelitian yang berlangsung pada bulan Agustus 2008 serta pembuatan laporan penelitian dari bulan September 2008 hingga Juni 2009.

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah data sekunder berupa foto liposom yang berasal dari penelitian Nelfidayani, dkk.¹⁹ Foto yang digunakan yaitu:

- Foto kamar hitung dengan skala Olympus.
- Foto liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi yang tidak diberi perlakuan (kontrol) pada hari ke-1 dengan penyimpanan pada suhu 4°C.
- Foto liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi yang tidak diberi perlakuan (kontrol) pada hari ke-90 dengan penyimpanan pada suhu 4°C.
- Foto liposom EPC-TEL 2,5 yang dipaparkan pada larutan NaCl 150 mOsmol pH 5 pada hari ke-1 dengan penyimpanan pada suhu 4°C.
- Foto liposom EPC-TEL 2,5 yang dipaparkan pada larutan NaCl 150 mOsmol pH 5 pada hari ke-90 dengan penyimpanan pada suhu 4°C.

- Foto liposom EPC-TEL 2,5 yang dipaparkan pada larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 5 pada hari ke-1 dengan penyimpanan pada suhu 4°C .
- Foto liposom EPC-TEL 2,5 yang dipaparkan pada larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 5 pada hari ke-90 dengan penyimpanan pada suhu 4°C .

3.3.2 Alat

Untuk mengukur diameter liposom, digunakan program *Image Pro Express*, yaitu program komputer khusus untuk menganalisis citra.⁴¹

3.4 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan dengan rumus Federer dengan enam kelompok perlakuan, yaitu:

1. Liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan NaCl 150 mOsmol pH 5 hari ke-1.
2. Liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan NaCl 150 mOsmol pH 5 hari ke-90.
3. Liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 5 hari ke-1.
4. Liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 5 hari ke-90.
5. Liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi tanpa perlakuan hari ke-1.
6. Liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi tanpa perlakuan hari ke-90.

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

t = jumlah kelompok perlakuan = 6

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$(n-1) 5 \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Dari perhitungan di atas didapatkan besar sampel minimal yang digunakan adalah empat untuk setiap kelompok perlakuan. Maka, diambil empat foto yang mewakili empat lapang pandang dalam setiap kelompok perlakuan. Pemilihan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling* karena dengan menggunakan uji statistik Kolmogorov-Smirnov terbukti bahwa data homogen dengan distribusi normal.

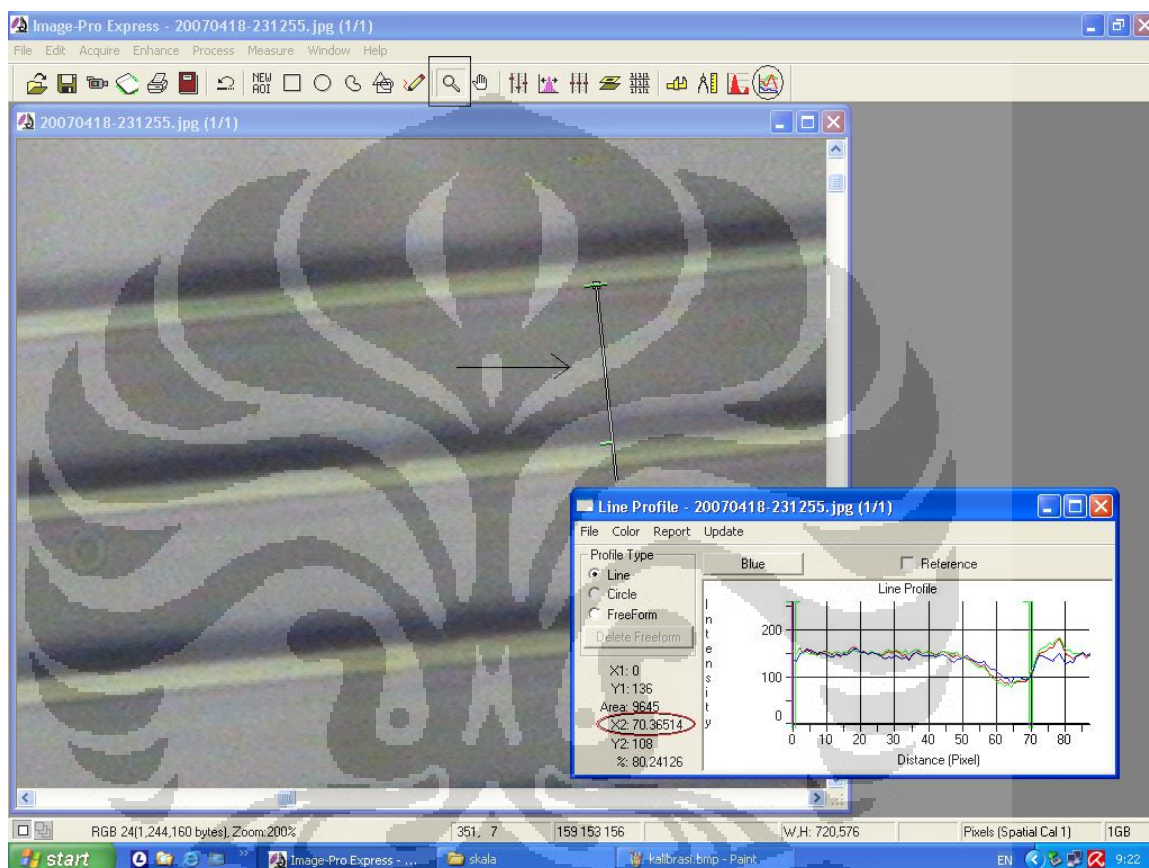
3.5 Cara Kerja

3.5.1 Kalibrasi

Program *Image Pro Express* menggunakan satuan pengukuran berupa piksel sedangkan data yang ingin didapatkan adalah dalam satuan nanometer. Oleh karena itu, perlu dilakukan penyesuaian dari satuan piksel menjadi satuan nanometer.

1. Membuka program *Image Pro Express* dan memilih foto kamar hitung yang akan digunakan.
2. Dengan menggunakan pilihan *magnify* (dilingkari dengan garis putus-putus) foto kamar hitung diperbesar sebanyak dua kali menjadi 200% ukuran asli agar pengukuran dapat lebih akurat.
3. Memilih ikon *line profile* (ditandai dengan kotak hitam) hingga muncul jendela *line profile* dan garis ukur yang memiliki pangkal berupa persegi kecil dan dua garis hijau pendek. Memastikan garis hijau pendek pertama berimpitan dengan pangkal garis ukur dengan cara menggeser garis hijau pada jendela *line profile* hingga berada pada angka 0.
4. Garis ukur diletakkan tegak lurus garis-garis kamar hitung.
5. Pangkal garis ukur diletakkan pada sisi dalam garis kamar hitung pertama sedangkan garis hijau kedua diletakkan pada sisi dalam garis kamar hitung kedua dengan cara menggeser garis hijau kedua pada jendela *line profile*.

6. Dilakukan pengukuran pada tiga jarak antara dua garis.
7. Membaca hasil pengukuran (ditandai dengan lingkaran hitam) yang merupakan nilai piksel dari panjang garis.
8. Hasil pengukuran dari Gambar 3.7: $\bullet\text{---}\bullet$: $100 \text{ nm} \approx \text{piksel}$
70.36514



Gambar 3.1. Cara Pengukuran Lebar Kamar Hitung pada Skala Olympus dengan Pembesaran Dua Kali

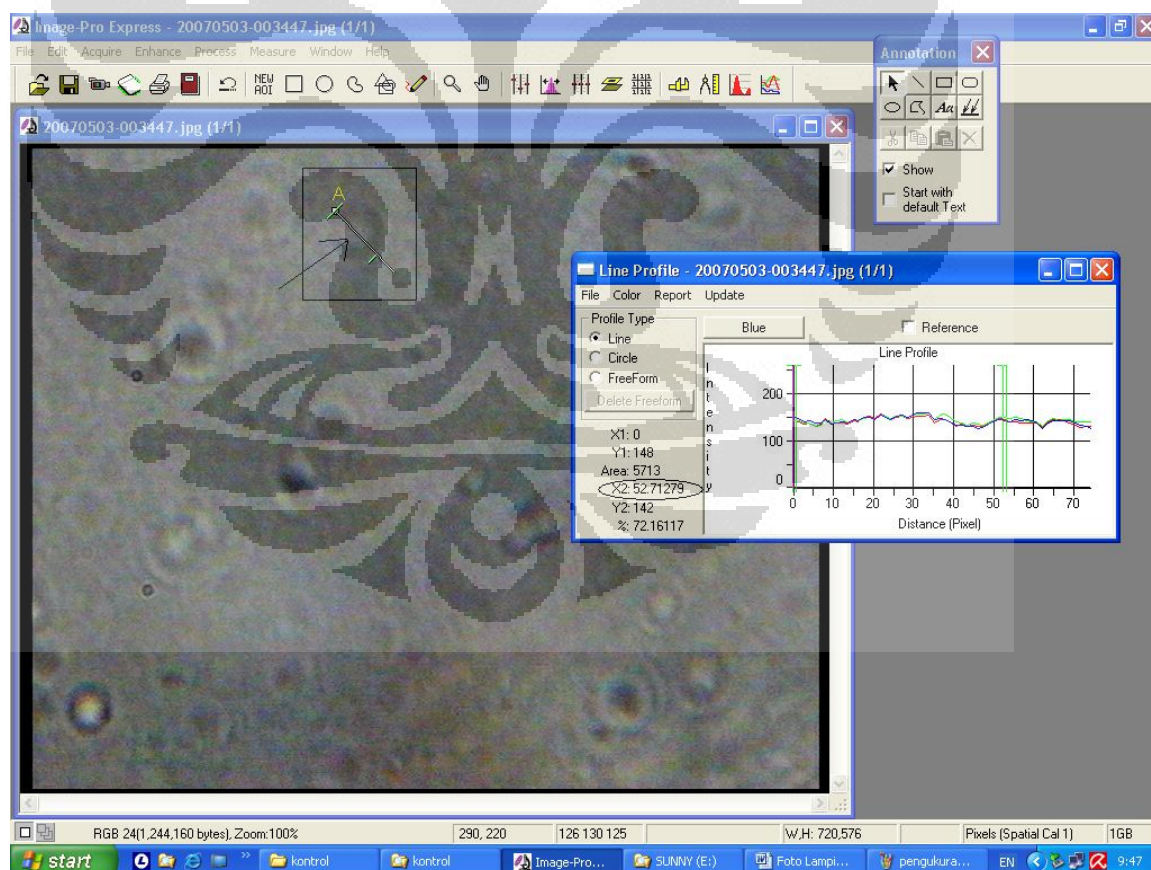
Keterangan: \longrightarrow : menunjukkan ruas garis yang diukur

3.5.2 Pengukuran Diameter Liposom

Pengukuran dilakukan pada empat foto liposom yang berasal dari enam kelompok perlakuan.

1. Memilih ikon *annotation* dan memberi label huruf pada setiap liposom.

2. Memilih ikon *line profile* dan menggunakan garis ukur untuk mengukur diameter liposom. Cara pengukuran sama seperti pengukuran kamar hitung. Setiap liposom diukur dua kali pada posisi garis yang berbeda sehingga didapatkan dua data yang kemudian dicari nilai reratanya.
3. Mengubah hasil pengukuran (ditandai dengan lingkaran hitam) dalam satuan piksel menjadi satuan nanometer.
4. Semua liposom yang berukuran lebih dari 100 nm diambil sedangkan liposom yang berukuran kurang dari atau sama dengan 100 nm dipilih dengan menggunakan teknik *simple random sampling* hingga didapatkan sepuluh ukuran diameter liposom. Untuk foto yang tidak memiliki sepuluh liposom, seluruh liposom dalam foto diambil.



Gambar 3.2. Cara Pengukuran Diameter Liposom pada Skala Olympus dengan Pembesaran Dua Kali.

Keterangan: \longrightarrow : menunjukkan ruas garis yang diukur
 A : liposom besar

3.6 Identifikasi Variabel

Variabel bebas pada penelitian ini adalah larutan garam fisiologis NaCl dan CaCl₂ 150 mOsmol dengan pH 5 yang dipaparkan pada liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi dengan penyimpanan dalam suhu 4° C. Variabel terikat adalah diameter liposom EPC-TEL 2,5 pada hari ke-1 dan hari ke-90. Skala yang digunakan adalah skala numerik.

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengukuran ini merupakan data numerik yang akan dianalisis dengan bantuan program SPSS versi 11.5. Langkah analisis yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Dengan menggunakan uji statistik Shapiro-Wilk serta batas kemaknaan $p=0,05$ didapatkan bahwa hasil uji normalitas adalah normal.
2. Pada penelitian ini digunakan hipotesis komparatif dengan variabel numerik pada lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan, maka uji yang dilakukan adalah uji One Way ANOVA.
3. Syarat uji ANOVA yaitu distribusi data yang normal dan varians data yang homogen. Dari uji varians didapatkan bahwa varians data adalah homogen.
4. Pada uji ANOVA didapatkan $p=0,000$ yang berarti terdapat perbedaan bermakna pada sedikitnya dua kelompok perlakuan.
5. Selanjutnya, dilakukan analisis *Post Hoc* untuk menentukan kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Setelah dilakukan kalibrasi, ditemukan bahwa dengan menggunakan program *Image Pro Express*, hasil pengukuran lebar kamar hitung yaitu antara dua garis dengan skala Olympus sebanyak tiga kali didapat nilai piksel sebesar: 70, 71, dan 70, dengan rerata 70,33. Dapat disimpulkan bahwa 100 nm pada skala Olympus sebanding dengan 70 piksel. Dengan demikian, rumus yang dipakai untuk menghitung diameter liposom pada keadaan sebenarnya adalah:

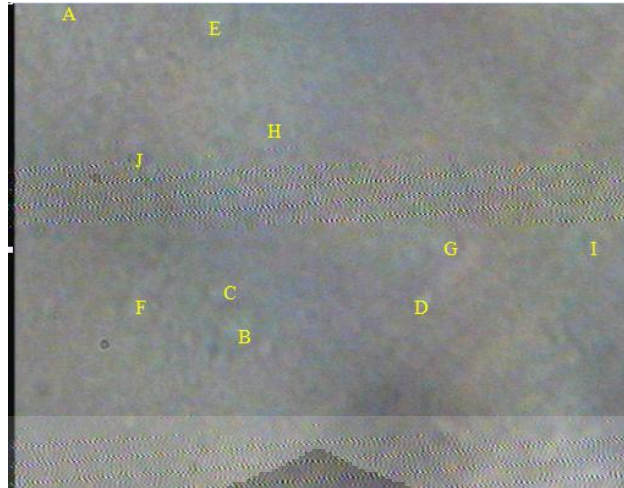
$$\text{Diameter liposom (nm)} = \frac{n}{70} \times 100 \text{nm}$$

n = piksel diameter liposom

Berikut ini adalah satu dari empat foto yang mewakili setiap kelompok liposom. Huruf-huruf pada foto menunjukkan liposom yang akan dipilih sepuluh di antaranya menggunakan teknik *simple random sampling*.



Gambar 4.1. Liposom Kontrol Hari Ke-1



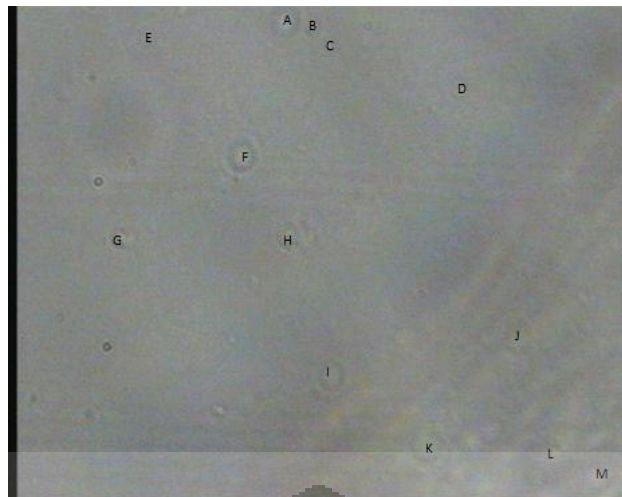
Gambar 4.2. Liposom Kontrol Hari ke-90



Gambar 4.3. Liposom dalam NaCl Hari Ke-1



Gambar 4.4. Liposom dalam NaCl Hari Ke-90



Gambar 4.5. Liposom dalam CaCl_2 Hari Ke-1



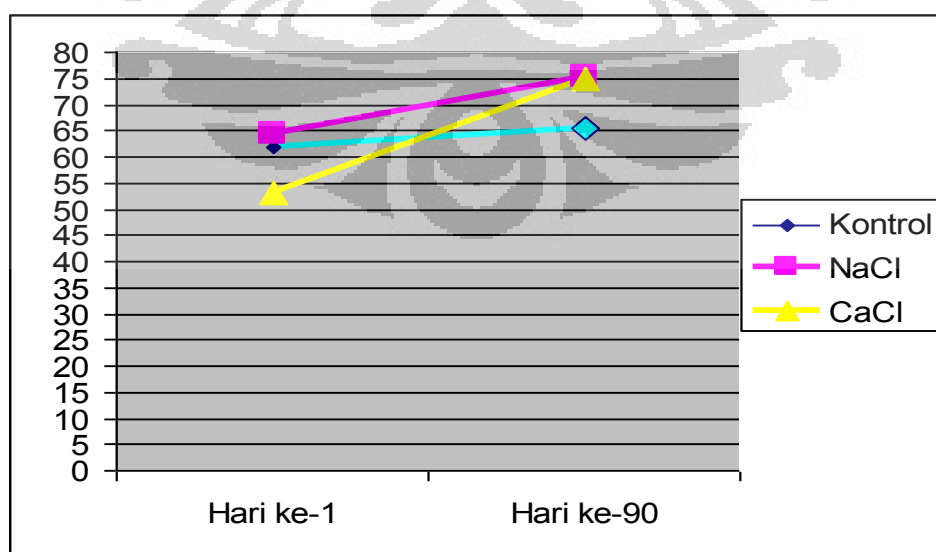
Gambar 4.6. Liposom dalam CaCl_2 Hari Ke-90

Setiap liposom diukur dengan posisi pengukuran yang berbeda, kemudian dikonversi dari satuan piksel menjadi satuan nanometer. Untuk setiap foto, kembali dicari nilai reratanya agar dapat dianalisis. Nilai rerata tersebut dibulatkan hingga dua angka di belakang koma, kemudian dihitung lagi rerata setiap kelompok perlakuan dari empat foto. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil Rerata Pengukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 pada Berbagai Perlakuan dengan Program *Image Pro Express*

Foto	Diameter liposom tanpa perlakuan / kontrol (nm)		Diameter liposom dalam NaCl 150 mOsmol pH 5 (nm)		Diameter liposom dalam CaCl ₂ 150 mOsmol pH 5 (nm)	
	Hari ke-1	Hari ke-90	Hari ke-1	Hari ke-90	Hari ke-1	Hari ke-90
	1	64,18	63,17	60,72	73,14	55,28
2	61,61	63,17	59,21	66,29	51,64	76,12
3	59,97	67,67	65,99	82,92	49,77	76,12
4	61,08	68,27	71,89	78,50	55,27	69,25
Rerata	61,71	65,57	64,45	75,21	52,99	75,08

Didapatkan bahwa diameter kelompok liposom kontrol hari ke-1 adalah 61,71 nm; diameter kelompok liposom kontrol hari ke-90 adalah 65,57 nm; diameter kelompok liposom terpapar NaCl hari ke-1 adalah 64,45 nm; diameter kelompok liposom terpapar NaCl hari ke-90 adalah 75,21 nm; diameter kelompok liposom terpapar CaCl₂ hari ke-1 adalah 52,99 nm; dan diameter kelompok liposom terpapar CaCl₂ hari ke-90 adalah 75,08 nm. Data ini ditampilkan kembali pada Grafik 1.



Grafik 1. Diameter liposom ketiga kelompok (kontrol; terpapar NaCl, CaCl₂)

Data rerata dari setiap kelompok perlakuan kemudian dianalisis menggunakan program SPSS versi 11.5. Berdasarkan uji statistik Shapiro-Wilk, sebaran data ditemukan normal. Selanjutnya, digunakan uji One Way ANOVA sebagai uji hipotesis komparatif dengan variabel numerik pada lebih dari dua kelompok tidak berpasangan dan didapatkan nilai $p=0,000$. Dengan batas kemaknaan $p=0,05$, dari uji tersebut ditemukan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada sedikitnya dua kelompok perlakuan.

Selanjutnya, dilakukan analisis *post hoc* untuk mengetahui dua kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna. Hasil uji ditampilkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Hasil Analisis *post hoc* terhadap Enam Kelompok Perlakuan

	Kelompok kontrol		Kelompok NaCl		Kelompok CaCl ₂	
	Hari ke-1	Hari ke-90	Hari ke-1	Hari ke-90	Hari ke-1	Hari ke-90
Kelompok Kontrol	Hari ke-1	p=0,237	p=0,396	p=0,000*	p=0,013*	p=0,000*
	Hari ke-90		p=0,728	p=0,007*	p=0,001*	p=0,007*
Kelompok NaCl	Hari ke-1			p=0,003*	p=0,002*	p=0,003*
	Hari ke-90				p=0,000*	p=0,967
Kelompok CaCl ₂	Hari ke-1					p=0,000*
	Hari ke-90					

Keterangan: *: berbeda bermakna

Dengan batas kemaknaan $p=0,05$, disimpulkan bahwa terdapat perbedaan diameter yang bermakna antara:

1. Kelompok liposom kontrol hari ke-1 dengan kelompok liposom dalam NaCl 150 mOsmol pH 5 hari ke-90.
2. Kelompok liposom kontrol hari ke-1 dengan kelompok liposom dalam CaCl_2 150 mOsmol pH 5 hari ke-1.
3. Kelompok liposom kontrol hari ke-1 dengan kelompok liposom dalam CaCl_2 150 mOsmol pH 5 hari ke-90.
4. Kelompok liposom kontrol hari ke-90 dengan kelompok liposom dalam NaCl 150 mOsmol pH 5 hari ke-1.
5. Kelompok liposom kontrol hari ke-90 dengan kelompok liposom dalam CaCl_2 150 mOsmol pH 5 hari ke-1.
6. Kelompok liposom kontrol hari ke-90 dengan kelompok liposom dalam CaCl_2 150 mOsmol pH 5 hari ke-90.
7. Kelompok liposom dalam NaCl 150 mOsmol pH 5 hari ke-1 dengan kelompok liposom dalam NaCl 150 mOsmol pH 5 hari ke-90.
8. Kelompok liposom NaCl 150 mOsmol pH 5 hari ke-1 dengan kelompok liposom dalam CaCl_2 150 mOsmol pH 5 hari ke-1.
9. Kelompok liposom dalam NaCl 150 mOsmol pH 5 hari ke-1 dengan kelompok liposom dalam CaCl_2 150 mOsmol pH 5 hari ke-90.
10. Kelompok liposom dalam NaCl 150 mOsmol pH 5 hari ke-90 dengan kelompok liposom dalam CaCl_2 150 mOsmol pH 5 hari ke-1.
11. Kelompok liposom dalam CaCl_2 150 mOsmol pH 5 hari ke-1 dengan kelompok liposom dalam CaCl_2 150 mOsmol pH 5 hari ke-90.

Selain itu, ditemukan pula bahwa tidak terdapat perbedaan diameter yang bermakna antara:

1. Kelompok liposom kontrol hari ke-1 dengan kelompok liposom kontrol hari ke-90.
2. Kelompok liposom kontrol hari ke-1 dengan kelompok liposom dalam NaCl 150 mOsmol pH 5 hari ke-1.
3. Kelompok liposom kontrol hari ke-90 dengan kelompok liposom dalam NaCl 150 mOsmol pH 5 hari ke-90.

4. Kelompok liposom dalam NaCl 150 mOsmol pH 5 hari ke-90 dengan kelompok liposom dalam CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 hari ke-90.

4.2 Pembahasan Hasil

Sebagai molekul pembawa obat, interaksi antara liposom dengan berbagai faktor dalam tubuh manusia perlu diteliti. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk melihat pengaruh ion-ion dalam tubuh, seperti Na⁺ dan Ca²⁺, terhadap liposom^{8,19}. Parameter kestabilan yang lazim digunakan pada berbagai penelitian adalah ukuran liposom. Pada penelitian ini diameter liposom yang merupakan variabel terikat diukur untuk melihat pengaruh larutan NaCl dan larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 terhadap diameter liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi setelah penyimpanan selama 90 hari pada suhu 4° C.

Kelebihan dari penelitian ini adalah penggunaan program komputer *Image Pro Express* yang membuat pengukuran diameter liposom menjadi lebih akurat dan sensitif daripada penghitungan secara manual. Pada penghitungan cara manual, liposom diukur berdasarkan skala ukur yang terdapat pada kaca preparat berskala Olympus. Kemudian, ditentukan dua kategori pengukuran liposom, yaitu: = 100 nm dan > 100 nm. Dengan menggunakan program komputer, ukuran liposom yang sebenarnya dapat diketahui dan perubahan diameter yang terjadi juga dapat diketahui secara lebih pasti.

Namun, penggunaan program komputer *Image Pro Express* memiliki kelemahan yang sama dengan cara penghitungan manual, yaitu ketergantungan terhadap operator. Penentuan diameter liposom menjadi subyektif karena foto yang diukur tidak terlalu jelas sehingga interpretasi setiap orang akan batas-batas liposom yang hendak diukur berbeda-beda. Saat ini, teknik terbaik dalam mengukur diameter liposom adalah dengan menggunakan *particle sizer*.³⁶⁻⁴⁰

EPC adalah bahan yang lazim digunakan untuk pembuatan liposom konvensional. Liposom konvensional yang hanya terdiri atas lipid ester ini sangat rentan terhadap degradasi oksidatif. Peroksidasi lipid terjadi karena terdapat rantai asil lemak yang

tidak tersaturasi. Sebagai akibat, liposom yang disimpan dalam suspensi cairan akan mengalami agregasi.¹⁰⁻¹¹

Penambahan TEL ke dalam komposisi lipid pada penelitian yang dilakukan oleh Purwaningsih dkk¹ dimaksudkan untuk membuktikan bahwa TEL juga dapat menstabilkan liposom konvensional selain jenis lipid lain yang sudah sering digunakan, antara lain kolesterol dan asam fosfatidat. TEL memiliki struktur rangka lipid tanpa ikatan rangkap, yaitu dua gugus kepala polar dengan tebal membran sekitar 4 nm, sehingga diharapkan dapat berinkorporasi dengan membran liposom EPC yang menyerupai pasak dan menjadikannya resisten terhadap oksidasi.

Sonikasi pada liposom EPC-TEL 2,5 menghasilkan liposom dengan ukuran yang lebih kecil, yaitu 10-50 nm sehingga termasuk SUV. Dengan ukuran yang lebih kecil, liposom dapat bersifat lebih stabil. Hal ini dikarenakan kemungkinan membran liposom yang satu berkontak dengan membran lainnya lebih kecil, sehingga memperkecil kesempatan terjadinya penggumpalan.¹⁰⁻¹¹

Aplikasi terapeutik liposom saat ini terutama menggunakan bentuk sediaan injeksi intravena. Produk liposom yang diaplikasikan secara parenteral sebaiknya terdefinisi baik dalam hal ukuran, muatan dan stabilitas liposom ketika berada dalam penyimpanan maupun saat digunakan secara *in vivo*.⁴³ Darah merupakan elemen lingkungan *in vivo* terpenting sehingga media penyimpanan liposom diupayakan memiliki komposisi serupa cairan fisiologis tersebut. Kebanyakan evaluasi stabilitas *in vitro* liposom bergantung pada inkubasi dalam plasma. Plasma, normalnya membentuk 55% bagian dari volume darah dan merupakan larutan yang mengandung ratusan ion, molekul dan makromolekul berbeda.³⁵ Ion yang dikandung antara lain adalah Ca^{2+} dan Na^+ . Pada penelitian ini, akan dilihat bagaimana pengaruh kedua ion tersebut (dalam bentuk garam) terhadap perubahan diameter liposom. Perubahan diameter ini nantinya akan digunakan untuk menilai stabilitas liposom.

Untuk memastikan bahwa liposom yang digunakan memang merupakan liposom EPC-TEL 2,5 hasil sonikasi yang berkualitas baik, diperlukan kelompok kontrol. Kelompok kontrol tidak mendapat perlakuan apapun kecuali penyimpanan yang sama pada suhu 4° C sehingga diharapkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna dalam hal

ukuran liposom tersebut pada hari ke-1 dan hari ke-90. Hasil percobaan mendapatkan bahwa memang tidak ada perbedaan bermakna dalam hal ukuran diameter antara kedua kelompok kontrol tersebut. Dapat disimpulkan bahwa liposom EPC-TEL 2,5 pada percobaan ini layak digunakan karena tidak terjadi perubahan bermakna pada diameter yang berkaitan dengan kestabilan.

Pada penelitian ini digunakan larutan NaCl dan larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5. NaCl maupun CaCl₂ dapat terurai menjadi ion Na⁺, Ca²⁺, dan Cl⁻ yang merupakan komponen penting dari cairan tubuh manusia dan berpengaruh terhadap kestabilan liposom. Selain ion-ion tersebut, terdapat pula osmolaritas, dan keasaman yang mungkin memiliki pengaruh. Liposom dapat terpapar dengan pH asam pada saat ia harus membawa obat yang bersifat asam maupun pada saat harus bekerja dalam tubuh manusia yang sedang mengalami asidosis.

Dari penelitian didapatkan adanya perbedaan bermakna dalam hal ukuran liposom setelah dipaparkan dengan larutan NaCl maupun larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 pada suhu 4°C selama 90° hari. Hal ini berarti ion Na⁺, ion Ca²⁺, osmolaritas sebesar 150 mOSmol, serta pH 5 memiliki pengaruh terhadap perubahan diameter liposom.

Apabila dilihat rerata diameter liposom untuk setiap kelompok perlakuan, ukuran liposom meningkat setelah dipaparkan dengan larutan NaCl maupun larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5. Pada penelitian ini, diameter liposom terbesar terdapat pada kelompok CaCl₂ hari ke-90 dengan nilai ukur sebesar 101,67 nm. Peningkatan nilai ukur liposom tersebut bermakna pada penelitian namun tidak bermakna secara klinis. Hal ini dikarenakan pada aplikasi di bidang kedokteran, liposom yang digunakan berukuran 80-200 nm.³ Selain itu, dari hasil penelitian ditemukan pula bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna dalam hal nilai ukur diameter liposom antara kelompok yang terpapar larutan NaCl dengan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 pada hari ke-90.

Terganggunya stabilitas liposom dapat terjadi akibat interaksi antara komponen dwilapis lipid dengan komponen plasma yang berakibat pada perubahan fase dari lamelar menjadi heksagonal. Hal semacam itu telah diamati pada pembentukan kompleks Ca²⁺-fosfatidilserin. Ion Ca²⁺ dalam berbagai konsentrasi telah dibuktikan memiliki pengaruh terhadap agregasi liposom.⁴⁴ Pengaruhnya terhadap ukuran

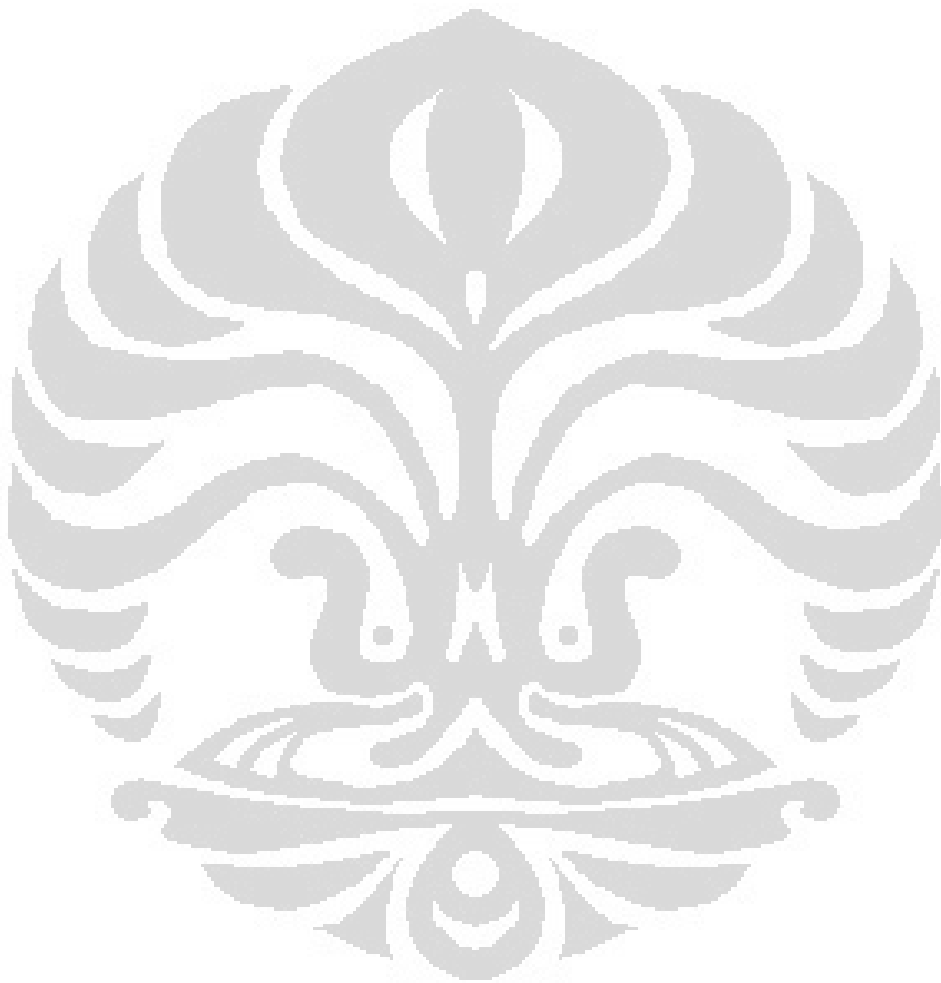
liposom terutama dapat diamati pada MLV, sedangkan SUV hanya sedikit terpengaruh. Perubahan ukuran tersebut dapat disebabkan oleh variasi komposisi liposom yang diinduksi oleh kalsium.⁴⁵

Ketika sebuah gradien osmotik dipaparkan pada liposom, dwilapis lipid harus berdilatasi atau mengkerut untuk mengakomodasi stres yang dialami. Hal ini berakibat pada adanya perubahan area per molekul pada dwilapis. Pada kasus unilamellar, tegangan membran dapat dicapai saat gradien osmotik adalah sekitar 20 mOsmol. Pada EPC yang tidak memiliki pori atau agen transporter sebagai obat (gramisidin, amfoterisin B, dan lain-lain), kemungkinan kebocoran Na⁺ dan Cl⁻ adalah sangat kecil.³⁷ Saat dipaparkan pada larutan 150 mOsmol, EPC membantu menstabilkan liposom dan mencegah kebocoran.

Epand RM dan Lim W⁴⁶ mendapatkan bahwa dalam kisaran pH 5 hingga pH 7 tidak terjadi perubahan dwilapis lipid menjadi heksagonal. pH mendekati netral dapat memperlambat proses hidrolisis karena hidrolisis ikatan ester yang terdapat pada EPC berlangsung lebih lambat. Selain itu, uji stabilitas liposom yang hanya terdiri atas TEL *T. acidophilum* saja menunjukkan bahwa TEL cukup stabil pada pH rendah dibandingkan pada pH netral ataupun basa.⁴⁷ Di lain pihak, studi oleh Zhang JA dan Pawelchak J⁴⁸ menemukan bahwa keasaman adalah faktor dominan yang menentukan laju hidrolisis lipid. Selain itu dikatakan pula bahwa liposom harus disimpan dalam buffer dengan keasaman sama dengan atau lebih dari 4,2 agar memiliki masa simpan selama satu tahun pada suhu 5° C. Oleh karena itu, disimpulkan bahwa faktor pH tidak berperan terhadap perubahan diameter liposom. Penambahan ukuran diameter ini nantinya dapat menjadi parameter dalam menentukan kestabilan.

Nelfidayani, dkk¹⁹ dalam penelitiannya menemukan bahwa tidak terdapat perbedaan diameter bermakna antara liposom yang dipaparkan dengan larutan NaCl 150 mOsmol pH 7 maupun dengan larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 7 selama penyimpanan 90 hari. Pada penelitian tersebut, diameter liposom dihitung berdasarkan skala pada preparat, kemudian dikategorikan menjadi >100 nm dan ≤ 100 nm. Keterbatasan alat ini menyebabkan penambahan diameter liposom tidak dapat diukur secara pasti sehingga tidak dapat dilakukan analisis data secara numerik.

Pada penelitian ini, dengan menggunakan foto-foto dari penelitian Nelfidayani, dkk¹⁹ dilakukan pengukuran diameter liposom secara pasti dengan program komputer *Image Pro Express*. Prinsip pengukuran dengan program komputer ini adalah mengukur jumlah piksel antara dua titik yang telah ditentukan.⁴¹ Dengan adanya data-data yang dapat dianalisis secara numerik, peneliti dapat menentukan secara lebih akurat adanya perbedaan bermakna antar tiap kelompok perlakuan.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Liposom EPC-TEL 2,5 yang dipaparkan kepada larutan NaCl 150 mOsmol pH 5 selama masa penyimpanan 90 hari pada suhu 4° C mengalami penambahan ukuran diameter ($p=0,003$). Hasil ini menunjukkan bahwa hipotesis pertama tidak dapat diterima.
2. Liposom EPC-TEL 2,5 yang dipaparkan kepada larutan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 selama masa penyimpanan 90 hari pada suhu 4° C mengalami penambahan ukuran diameter ($p=0,000$). Hasil ini menunjukkan bahwa hipotesis kedua tidak dapat diterima.
3. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara nilai ukur diameter liposom EPC-TEL 2,5 dengan paparan NaCl dibandingkan paparan CaCl₂ 150 mOsmol pH 5 selama masa penyimpanan 90 hari pada suhu 4° C ($p=0,967$). Hasil ini menunjukkan bahwa hipotesis ketiga dapat diterima.

5.2 Saran

Penelitian ini masih perlu dilanjutkan, terutama mengenai pengaruh penambahan diameter bagi kestabilan liposom EPC-TEL 2,5 secara kimiawi dengan menggunakan desain penelitian eksperimental. Selain itu, kestabilan liposom EPC-TEL 2,5 secara fisika dan biologi juga perlu ditelaah lebih lanjut. Agar mendapat hasil terbaik dalam hal akurasi, sebaiknya penelitian dilakukan dengan bantuan *particle sizer*. Namun, sebagai alternatif sarana pengukuran yang relatif lebih murah, praktis, dan sama-sama dapat diandalkan, dapat pula digunakan program komputer *Image Pro Plus*.

DAFTAR REFERENSI

1. Purwaningsih EH, Freisleben HJ, Sadikin M. Inkorporasi Metilprednisolonpalmitat pada Membran Liposom yang Mengandung Tetraeter Lipid dari Membran *Sulfolobus acidocaldarius*, membentuk Sediaan Baru Metilprednisolon Palmitat. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2002;1(1):24-30.
2. Lasic DD (ed). Liposomes as a drug delivery system. In: *Liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993:265-324.
3. Lasic DD (ed). Liposomes. In: *Science and Medicine* 1996 (May-June):34-43.
4. Anonim. Liposome. Diunduh dari: www.brittanica.com, 27 Februari 2009.
5. Schwendener et al. Liposomes: General Properties. In: *Acta* 1990;1026:69-79.
6. Lasic DD (ed). Chemistry of lipids and liposomes. In: *Liposomes from Physics to Application*. Elsevier Science Publisher BV 1993:1-42.
7. New RRC (ed). Introduction. In: *Liposomes. A Practical Approach*. IRL Press 1990:1-31.
8. Purwaningsih EH, Arozal W, Jusman SW. Uji Stabilitas Fisik, Kimia dan Biologik terhadap formulasi terbaru liposome tetra eter lipid (EPC-TEL 2,5) sebagai pembawa obat (*Drug Carrier*). *Makara* 2007;11(2):84-9.
9. Sherwood L. The plasma membrane and membrane potential. In: *Human Physiology*. Thomson Learning 2004: 57-97.
10. Stern J, Freisleben HJ, Janku S, Ring K. Black lipid membranes of tetraether lipids from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim Biophys Acta* 1992;1128:227-36.
11. Freisleben HJ, Henkel L, Gutermann R, Rudolph P, John G, Sternberg B, et al. Fermentor Cultivation of *Thermoplasma acidophilum* for the Production of Cell Mass and the Main Phospholipid Fraction. *Appl Microbial Biotech* 1994;40:745-52.
12. Sugai A, Sakuma R, Fukuda I, Kurosawa N, Itoh YH, Kon K, et al. The Structure of the Core Polyol of the Ether Lipids from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Lipids* 1995;30(4):339-44.
13. Krondberg B, Dahlman A, Carlfors J, Karlsson J, Artursson P. Preparation and

- Evaluation of Sterically Stabilized Liposomes: Coloidal Stability, Serum Stability, Macrophage Uptake and Toxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1990;79(8): 667-671.
14. Anonim. Particle Size Analysis of Liposome. Diunduh dari: <http://www.lab.hii.horiba.com/file/AN174%20Particle%20Size%20Analysis%20of%20Liposomes.pdf>, 2 Juni 2009.
 15. Litzinger DC, Buiting AMJ, van Rooijen N, Huang L. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1994(1190):99-107.
 16. Kikuchi H, Yamauchi H, Hirota S. A polyol dilution method for mass production of liposomes. *Journal of Liposome Research* 1994;4(1):71-91.
 17. Anonim. Image Pro Plus. Diunduh dari: <http://www.mediacy.com/index.aspx>, 28 Maret 2009.
 18. Anonim. A short walk through Image Pro Plus 6.0. Diunduh dari: <http://web.uvic.ca/ail/techniques/imagepro.html>, 28 Maret 2009.
 19. Nelfidayani. Formulasi Baru Liposom Tetraeter Lipid (EPC-TEL 2,5) Hasil Sonikasi dan Stabilitasnya dalam Larutan NaCl dan MgCl₂ 150 mOsm pH 7. Skripsi Program Pendidikan Dokter Umum FKUI. Mei 2008.
 20. Stryer L. Struktur dan Dinamika Membran. In: *Biokimia*. EGC 1996:263-89.
 21. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds). *Membranes: Structure and Function*. In: *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th ed. McGrawHill 2003:415-33.
 22. RRC New. *Liposomes a practical approach*. Oxford: IRL PRESS 1990:1-31; 105-10; 221-7.
 23. Schwendener. *Liposomes: General Properties*. *Acta* 1026(1990):69-79.
 24. Daniels R. Liposome-Classification, Processing Technologies, Industry Application and Risk Assessment. In: *Galenic Principles of Modern Skin Products* 2000:85-9.
 25. Bergstrand N. *Liposomes for Drug Delivery: from Physico-chemical studies to applications [dissertation]*. Uppsala University; 2003.
 26. Freisleben HJ, Neisser C, Hartmann M, Rudolph P, Geck P, Ring K, et al.

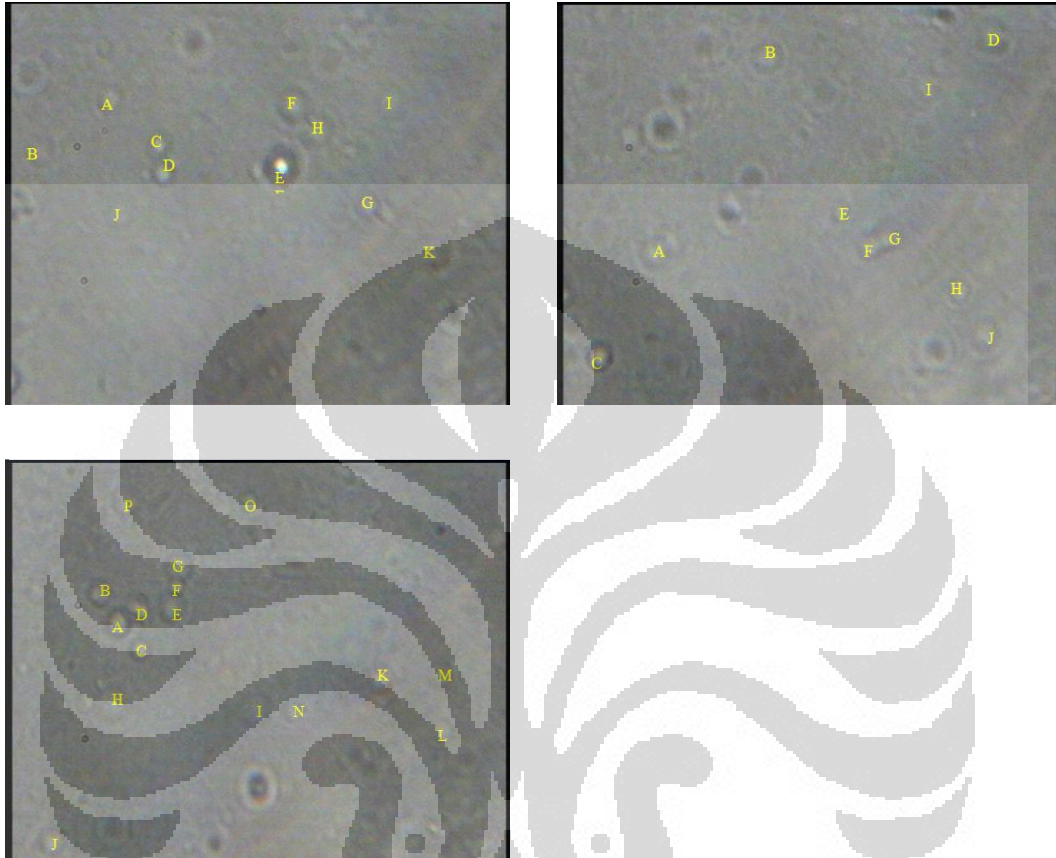
- Influence of the main phospholipids (MPL) from *Thermoplasma acidophilum* and of liposomes from MPL on living cells: cytotoxicity and mutagenicity. *Journal Liposome Research* 1993;3(3):817-33.
27. Freisleben HJ, Bormann J, Litzinger DC, Lehr F, Rudolph P, Schatton W, et al. Toxicity and biodistribution of liposomes of the main phospholipids from the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum* in mice. *Journal Liposome Research* 1995;5(1):215-23.
 28. De Rosa M, Gambacorta A, Gliozzi A. [Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids](#). *Microbiol. Rev.* 1986;50(1): 70–80.
 29. Damsté JS, Schouten S, Hopmans EC, van Duin AC, Geenevasen JA. [Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota](#). *J. Lipid Res.* 2002;43(10): 1641–51.
 30. Stern J, Freisleben HJ, Janku S, Ring K. Black Lipid Membranes of Tetraether Lipids from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim Biophys Acta* 1992;1128:227-36.
 31. New RRC (ed). Characterization of Liposomes. In: *Liposomes. A Practical Approach*. IRL Press 1990:105-61.
 32. Winter M. Calcium compounds: calcium dichloride. Diunduh dari: www.webelements.com, 28 Maret 2009.
 33. Feldman SR. Sodium chloride. In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons. Published Online 2005. doi:10.1002/0471238961.191.5040902051820.a01.pub2.
 34. Anonim. Sodium chloride. Diunduh dari: www.commons.wikimedia.org, 28 Maret 2009.
 35. Irawan AM. Cairan tubuh, elektrolit, dan mineral. Diunduh dari: www.pssplab.com, 14 Maret 2009.
 36. Hantz E, Cao A, Escaig J, Taillandier E. The osmotic response of large unilamellar vesicles studied by quasielastic light scattering. *Biochimica et Biophysica Acta* 1986; 862:379-86.

37. Litzinger DC, Buiting AMJ, van Rooijen N, Huang L. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphiphatic poly(ethylene-glycol)-containing liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1994;1190:99-107.
38. Johson T, Caldow R, Potcher A, Mirme A, Kittelson DB. A New Electrical Mobility Particle Sizer Spectrometer for Engine Exhaust Particle Measurements. SAE World Congress and Exhibition 2004.
39. Gulijk CV. Measuring diesel soot with a scanning mobility particle sizer and an electrical low-pressure impactor: performance assessment with a model for fractal-like agglomerates. *Journal of Aerosol Science* 2004; 35: 633-55.
40. Anonim. Particle sizer. Diunduh dari: www.npl.co.uk, 28 Maret 2009.
41. Anonim. Short course to Image Pro-Plus Version 6.0. Diunduh dari: www.photometrics.de/pdfs/image_pro-plus.pdf, 28 Maret 2009.
42. Betageri GV, Jenkins SA, Parsons DL. Liposome Drug Delivery System". *Informa Health Care* 1993:107-11.
43. Mosharraf M, Taylor KMG, Craig DQM. Effect of calcium ions on the surface charge and aggregation of phosphatidylcholine liposome. *Journal of Drug Targeting* 1995;6(2):541-5.
44. Hernandez J, Pouplana R, Estelrich J. Interaction between liposomes and monolayers in the presence of calcium. *Journal of Dispersion Science and Technology* 1988;9:223-34.
45. Epand RM, Lim W. Mechanisms of liposome destabilization by polycationic amino acids. *Biosci-Rep* 1995 Jun;15(3):151-60.
46. Patel GB, Agnew BJ, Deschatelets L, Fleming LP. In vitro assessment of archaesome stability for developing oral delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* 2000;194:39-49.
47. Zhang JA, Pawelchak J. Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions. *Eur J Pharm Biopharm* 2000 Nov;50(3):357-64.

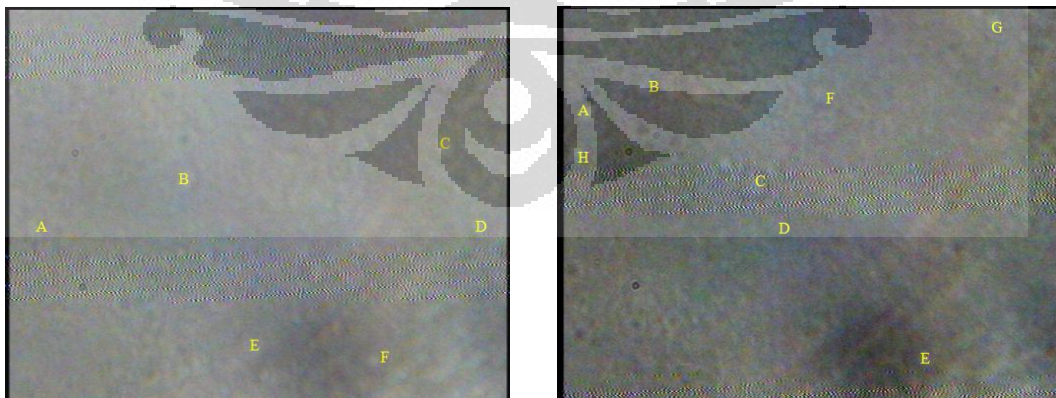
Lampiran 1. Foto Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi

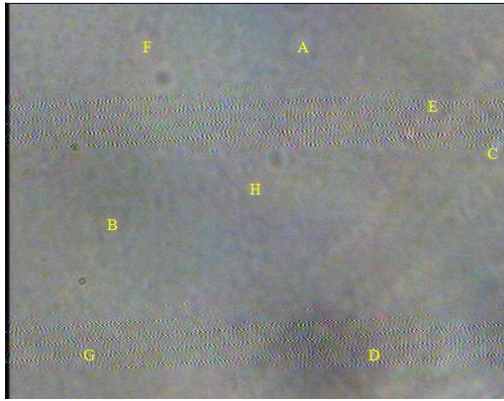
1. Kelompok kontrol

a. Hari ke-1



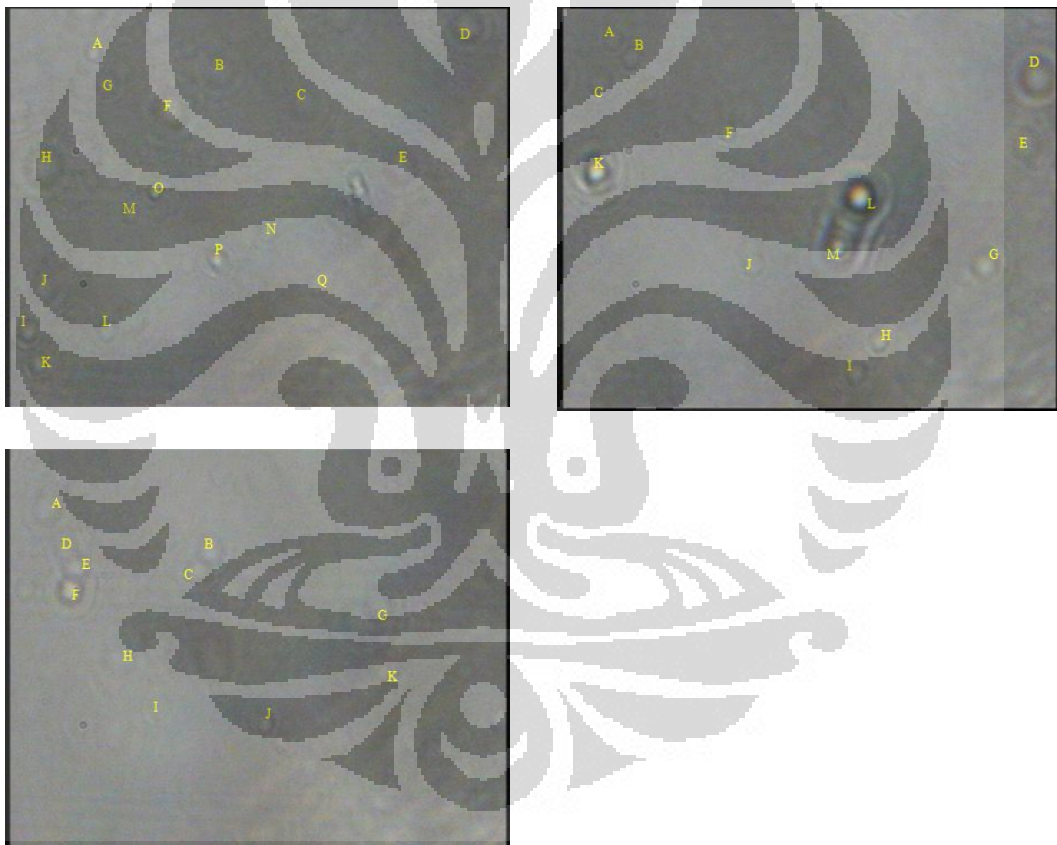
b. Hari ke-90



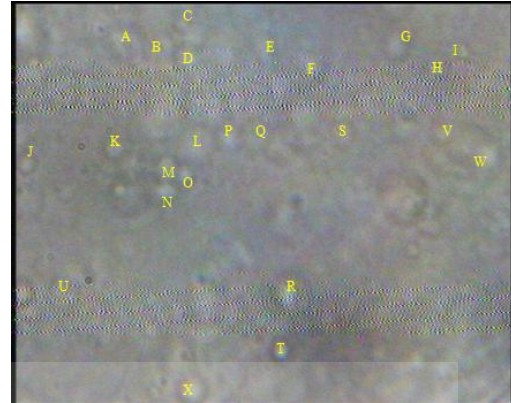
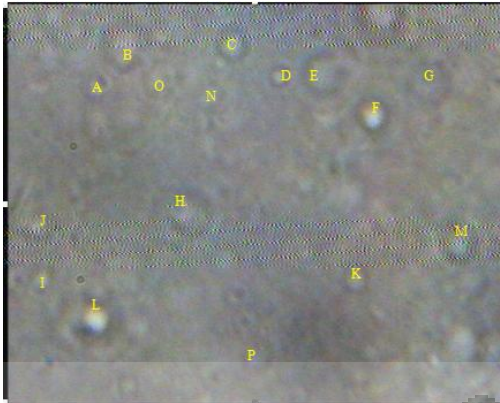


2. Kelompok Liposom dalam Larutan NaCl 150 mOsmol pH 5

a. Hari ke-1

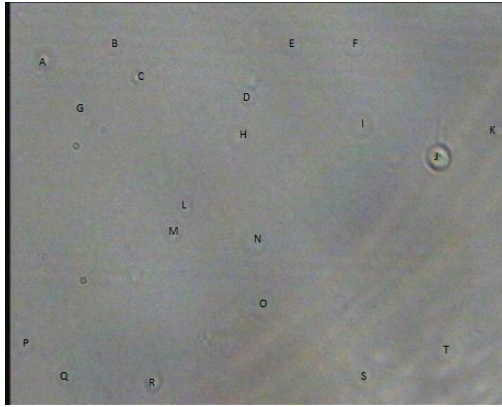


b. Hari ke-90

3. Kelompok Liposom dalam larutan CaCl_2 150 mOsmol pH 5

a. Hari ke-1





b. Hari ke-90



Keterangan: Semua huruf dalam foto menunjukkan semua liposom yang terdapat dalam foto dan yang akan dipilih sepuluh di antaranya menggunakan teknik *simple random sampling* untuk kemudian diukur.

Lampiran2. Hasil Pengukuran Diameter Liposom EPC-TEL 2,5 Hasil Sonikasi dengan Program Image Pro Express

Liposom 150 mOsmol Hari ke-1 sonikasi Kontrol					Liposom 150 mOsmol Hari ke-90 sonikasi Kontrol				
	x1	x2	mean	diameter (nm)		x1	x2	mean	diameter (nm)
Foto 1	48,92	47,25	48,085	68,69286	Foto 1	42,53	42,1	42,315	60,45
3436	37,14	34,15	35,645	50,92143	33446	39,5	37,04	38,27	54,67143
	46,61	46,31	46,46	66,37143		39,79	37,39	38,59	55,12857
	45,95	43,03	44,49	63,55714		53,27	53,81	53,54	76,48571
	45,51	47,41	46,46	66,37143		48,99	50,56	49,775	71,10714
	45,94	41,48	43,71	62,44286		42,23	43,41	42,82	61,17143
	48,21	50,39	49,3	70,42857					63,16905
	48,35	48,96	48,655	69,50714	Foto 2	41,08	42,06	41,57	59,38571
	49,75	44,2	46,975	67,10714	33438	42,62	41,92	42,27	60,38571
	40,11	38,78	39,445	56,35		35,57	33,95	34,76	49,65714
				64,175		52,15	50,62	51,385	73,40714
Foto 2	50,69	47,87	49,28	70,4		45,68	41,05	43,365	61,95
3447	52,86	44,18	48,52	69,31429		52,54	59,67	56,105	80,15
	42,17	44,02	43,095	61,56429		36,16	38,22	37,19	53,12857
	41,02	37,53	39,275	56,10714		45,39	48,8	47,095	67,27857
	32,6	34,43	33,515	47,87857					63,16786
	35,75	34,34	35,045	50,06429	Foto 3	58,39	58,64	58,515	83,59286
	44,39	52,11	48,25	68,92857	33424	40,3	42,74	41,52	59,31429
	50,26	56,39	53,325	76,17857		36,55	35,19	35,87	51,24286
	39,3	41,68	40,49	57,84286		54,78	51,68	53,23	76,04286
	41,24	39,69	40,465	57,80714		40,62	41,86	41,24	58,91429
				61,60857		52,43	55,21	53,82	76,88571
Foto 3	41,73	38,64	40,185	57,40714		47,52	49,56	48,54	69,34286
3517	40,94	39,78	40,36	57,65714		49,19	49,94	49,565	70,80714
	39,51	43,02	41,265	58,95					68,26786
	37,36	32,65	35,005	50,00714	Foto 4	35,94	37,91	36,925	52,75
	49,13	46,86	47,995	68,56429	33444	54,93	53,98	54,455	77,79286
	29,43	31,41	30,42	43,45714		48,48	49,55	49,015	70,02143
	51,68	48,71	50,195	71,70714		45,83	44,2	45,015	64,30714
	55,07	51,53	53,3	76,14286		40	41,99	40,995	58,56429
	42,29	46,88	44,585	63,69286		45,47	46,06	45,765	65,37857
	36,13	36,8	36,465	52,09286		46,01	44	45,005	64,29286
				59,96786		49,06	46,35	47,705	68,15
Foto 4	51,51	49,98	50,745	72,49286		61,37	62,35	61,86	88,37143
3522	51,45	50,84	51,145	73,06429		46,03	47,84	46,935	67,05
	37,28	35,44	36,36	51,94286					67,66786
	46,39	46,16	46,275	66,10714					
	47,35	49,67	48,51	69,3					
	39,66	41,24	40,45	57,78571					
	33,72	30,07	31,895	45,56429					
	41,01	40,59	40,8	58,28571					
	37,11	37,26	37,185	53,12143					
	43,81	44,61	44,21	63,15714					
				61,08214					

Liposom 150 mOsmol
Hari ke-1 sonikasi
NaCl pH5

	x1	x2	mean	diameter (nm)
Foto 1	54,37	54,27	54,32	77,6
4018	51,89	50,86	51,375	73,39286
	54,51	52,06	53,285	76,12143
	35	34,76	34,88	49,82857
	44,76	44,89	44,825	64,03571
	38,15	37,87	38,01	54,3
	35,82	39,74	37,78	53,97143
	42,72	40,61	41,665	59,52143
	37,56	34,78	36,17	51,67143
	31,68	33,82	32,75	46,78571
				60,72286
Foto 2	47,05	45,06	46,055	65,79286
4049	42,91	40,53	41,72	59,6
	36,73	38,08	37,405	53,43571
	33,09	34,18	33,635	48,05
	35,18	36,31	35,745	51,06429
	37,07	37,33	37,2	53,14286
	49,27	50,33	49,8	71,14286
	52,31	50,15	51,23	73,18571
	40,82	40,78	40,8	58,28571
	40,78	41,04	40,91	58,44286
				59,21429
Foto 3	49,74	49,5	49,62	70,88571
4105	45,83	45,6	45,715	65,30714
	45,61	46,19	45,9	65,57143
	47,59	47	47,295	67,56429
	43,29	44,47	43,88	62,68571
	49,77	49,93	49,85	71,21429
	46,09	44,41	45,25	64,64286
	37,39	38,9	38,145	54,49286
	35,37	36,75	36,06	51,51429
	60,42	60,04	60,23	86,04286
				65,99214
Foto 4	50,78	51,42	51,1	73
4200	59,73	58,74	59,235	84,62143
	60,87	60,34	60,605	86,57857
	47,14	45,75	46,445	66,35
	53,35	55	54,175	77,39286
	44,25	42,37	43,31	61,87143
	42,37	43,02	42,695	60,99286
	44,67	44,98	44,825	64,03571
	49,09	49,12	49,105	70,15
	51,23	52,18	51,705	73,86429
				71,88571

Liposom 150 mOsmol
Hari ke-90 sonikasi
NaCl pH5

	x1	x2	mean	diameter (nm)
Foto 1	36,39	38,48	37,435	53,47857
33925	53,51	53,5	53,505	76,43571
	29,98	31,15	30,565	43,66429
	66,19	65,44	65,815	94,02143
	63	65,09	64,045	91,49286
	49	52,09	50,545	72,20714
	48,32	45,19	46,755	66,79286
	45,19	46,04	45,615	65,16429
	55,32	52,83	54,075	77,25
	64,45	62,77	63,61	90,87143
				73,13786
Foto 2	49,42	50,69	50,055	71,50714
33932	48,57	50,09	49,33	70,47143
	40,61	40,09	40,35	57,64286
	44,01	46,87	45,44	64,91429
	50,01	50,08	50,045	71,49286
	45,94	47,41	46,675	66,67857
	48,73	49,34	49,035	70,05
	41,34	43,75	42,545	60,77857
	52,29	49,72	51,005	72,86429
	38,8	40,28	39,54	56,48571
				66,28857
Foto 3	74,38	74,13	74,255	106,0786
33934	55,04	57,13	56,085	80,12143
	63,26	66,48	64,87	92,67143
	74,4	72,99	73,695	105,2786
	61,86	62,01	61,935	88,47857
	45,84	46,92	46,38	66,25714
	48,09	46,13	47,11	67,3
	48,51	48,93	48,72	69,6
	54,07	54,99	54,53	77,9
	52,05	53,73	52,89	75,55714
				82,92429
Foto 4	64,52	65,79	65,155	93,07857
33935	49,98	48,99	49,485	70,69286
	64,54	61,36	62,95	89,92857
	65,67	67,15	66,41	94,87143
	55,77	54,34	55,055	78,65
	54,69	55	54,845	78,35
	46	48,27	47,135	67,33571
	56,67	56,14	56,405	80,57857
	56,12	42,1	49,11	70,15714
	42,41	43,5	42,955	61,36429
				78,50071

Liposom 150 mOsmol
Hari ke-1 sonikasi
CaCl2 pH5

	x1	x2	mean	Diameter (nm)
Foto 1	32,16	33,6	32,88	46,97143
10733	30,85	32,87	31,86	45,51429
	34,01	34,45	34,23	48,9
	35,39	37,87	36,63	52,32857
	50,5	46,41	48,455	69,22143
	46,42	43,68	45,05	64,35714
	31,08	33,84	32,46	46,37143
	42,27	42,3	42,285	60,40714
	36,55	34,75	35,65	50,92857
	47,94	47,01	47,475	67,82143
				55,28214
Foto 2	44,2	42,63	43,415	62,02143
10745	40,99	38,46	39,725	56,75
	34,69	34,55	34,62	49,45714
	31,4	32,01	31,705	45,29286
	30,75	30,23	30,49	43,55714
	36,77	38,82	37,795	53,99286
	37,52	37,07	37,295	53,27857
	34,73	36,12	35,425	50,60714
	39,37	40,36	39,865	56,95
	31,67	30,55	31,11	44,44286
				51,635
Foto 3	33,6	35,38	34,49	49,27143
10756	31,81	31,73	31,77	45,38571
	34,28	36,74	35,51	50,72857
	27,53	30,34	28,935	41,33571
	38,25	40,48	39,365	56,23571
	40,48	40,2	40,34	57,62857
	30,5	31,3	30,9	44,14286
	34,53	33,75	34,14	48,77143
	40,11	42,28	41,195	58,85
	31,47	32,02	31,745	45,35
				49,77
Foto 4	40,64	40,5	40,57	57,95714
10816	40,09	40,1	40,095	57,27857
	37,34	38,49	37,915	54,16429
	37,6	36,47	37,035	52,90714
	41,4	44,26	42,83	61,18571
	43,18	40,22	41,7	59,57143
	36,96	38,34	37,65	53,78571
	38,34	38,46	38,4	54,85714
	34,85	36,01	35,43	50,61429
	35,66	34,91	35,285	50,40714
				55,27286

Liposom 150 mOsmol
Hari ke-90 sonikasi
CaCl2 pH5

	x1	x2	mean	Diameter (nm)
Foto 1	63,95	64,26	64,105	91,57857
40318	64,26	65,77	65,015	92,87857
	69,45	67,71	68,58	97,97143
	63,95	63,71	63,83	91,18571
	51,9	49,9	50,9	72,71429
	69,23	70,89	70,06	100,0857
	42,09	40,49	41,29	58,98571
	47,42	49,25	48,335	69,05
	42,34	43,28	42,81	61,15714
	38,25	35,45	36,85	52,64286
				78,825
Foto 2	56,73	59,21	57,97	82,81429
40331	61,42	60,36	60,89	86,98571
	44,36	44,72	44,54	63,62857
	34,79	34,73	34,76	49,65714
	43,66	41,9	42,78	61,11429
	63,28	61,22	62,25	88,92857
	47,1	46,14	46,62	66,6
	49,81	50,05	49,93	71,32857
	69,12	63,85	66,485	94,97857
	65,21	68,05	66,63	95,18571
				76,12214
Foto 3	69,29	71,79	70,54	100,7714
40333	68,37	66,5	67,435	96,33571
	57,16	55,69	56,425	80,60714
	44,49	48,39	46,44	66,34286
	48,39	51,94	50,165	71,66429
	51,94	52,63	52,285	74,69286
	41,55	42,77	42,16	60,22857
	39,21	35,76	37,485	53,55
	42,39	45,44	43,915	62,73571
	40,15	42,77	41,46	59,22857
				72,61571
Foto 4	63,19	61,36	62,275	88,96429
40335	46,3	45,09	45,695	65,27857
	33,81	32,41	33,11	47,3
	42,39	41,3	41,845	59,77857
	48,59	49,16	48,875	69,82143
	70,42	71,92	71,17	101,6714
	37,79	38,38	38,085	54,40714
	38,67	39,81	39,24	56,05714
	63,62	62,87	63,245	90,35
	41,6	40,76	41,18	58,82857
				69,24571

Lampiran 3. Analisis Data

Case Processing Summary

Perlakuan	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
diameter Kontrol hari ke-1	4	100,0%	0	,0%	4	100,0%
Kontrol hari ke-90	4	100,0%	0	,0%	4	100,0%
NaCl hari ke-1	4	100,0%	0	,0%	4	100,0%
NaCl hari ke-90	4	100,0%	0	,0%	4	100,0%
CaCl2 hari ke-1	4	100,0%	0	,0%	4	100,0%
CaCl2 hari ke-90	4	100,0%	0	,0%	4	100,0%

Tests of Normality

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
diameter Kontrol hari ke-1	,272	4	.	,933	4	,610
Kontrol hari ke-90	,306	4	.	,779	4	,070
NaCl hari ke-1	,242	4	.	,928	4	,584
NaCl hari ke-90	,177	4	.	,985	4	,931
CaCl2 hari ke-1	,297	4	.	,851	4	,231
CaCl2 hari ke-90	,351	4	.	,863	4	,270

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

diameter

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,423	5	18	,076

ANOVA

diameter

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1429,572	5	285,914	14,342	,000
Within Groups	358,833	18	19,935		
Total	1788,405	23			

Analisis *post hoc*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: diameter

LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol hari ke-1	Kontrol hari ke-90	-3,85976	3,15715	,237	-10,4927	2,7732
	NaCl hari ke-1	-2,74536	3,15715	,396	-9,3783	3,8876
	NaCl hari ke-90	-13,50446*	3,15715	,000	-20,1374	-6,8715
	CaCl ₂ hari ke-1	8,71839*	3,15715	,013	2,0855	15,3513
	CaCl ₂ hari ke-90	-13,37036*	3,15715	,000	-20,0033	-6,7374
Kontrol hari ke-90	Kontrol hari ke-1	3,85976	3,15715	,237	-2,7732	10,4927
	NaCl hari ke-1	1,11440	3,15715	,728	-5,5185	7,7473
	NaCl hari ke-90	-9,64470*	3,15715	,007	-16,2776	-3,0118
	CaCl ₂ hari ke-1	12,57815*	3,15715	,001	5,9452	19,2111
	CaCl ₂ hari ke-90	-9,51060*	3,15715	,007	-16,1435	-2,8777
NaCl hari ke-1	Kontrol hari ke-1	2,74536	3,15715	,396	-3,8876	9,3783
	Kontrol hari ke-90	-1,11440	3,15715	,728	-7,7473	5,5185
	NaCl hari ke-90	-10,75911*	3,15715	,003	-17,3920	-4,1262
	CaCl ₂ hari ke-1	11,46375*	3,15715	,002	4,8308	18,0967
	CaCl ₂ hari ke-90	-10,62500*	3,15715	,003	-17,2579	-3,9921
NaCl hari ke-90	Kontrol hari ke-1	13,50446*	3,15715	,000	6,8715	20,1374
	Kontrol hari ke-90	9,64470*	3,15715	,007	3,0118	16,2776
	NaCl hari ke-1	10,75911*	3,15715	,003	4,1262	17,3920
	CaCl ₂ hari ke-1	22,22286*	3,15715	,000	15,5899	28,8558
	CaCl ₂ hari ke-90	,13411	3,15715	,967	-6,4988	6,7670
CaCl ₂ hari ke-1	Kontrol hari ke-1	-8,71839*	3,15715	,013	-15,3513	-2,0855
	Kontrol hari ke-90	-12,57815*	3,15715	,001	-19,2111	-5,9452
	NaCl hari ke-1	-11,46375*	3,15715	,002	-18,0967	-4,8308
	NaCl hari ke-90	-22,22286*	3,15715	,000	-28,8558	-15,5899
	CaCl ₂ hari ke-90	-22,08875*	3,15715	,000	-28,7217	-15,4558
CaCl ₂ hari ke-90	Kontrol hari ke-1	13,37036*	3,15715	,000	6,7374	20,0033
	Kontrol hari ke-90	9,51060*	3,15715	,007	2,8777	16,1435
	NaCl hari ke-1	10,62500*	3,15715	,003	3,9921	17,2579
	NaCl hari ke-90	-,13411	3,15715	,967	-6,7670	6,4988
	CaCl ₂ hari ke-1	22,08875*	3,15715	,000	15,4558	28,7217

*. The mean difference is significant at the .05 level.