

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental untuk mengetahui kestabilan biologik TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 secara *in vivo* pada hepar mencit.

#### 3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Departemen Farmasi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada bulan Maret 2007 – Maret 2008, dengan rincian sebagai berikut: penyelesaian proposal dan perencanaan pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Maret 2007, pelaksanaan eksperimen dilakukan pada bulan April 2007 hingga bulan Juli 2007, pengolahan dan analisis data dilakukan pada bulan Agustus 2007 hingga bulan Januari 2008, dan pembuatan laporan penelitian beserta format publikasi dilakukan pada bulan Februari 2008 hingga bulan Maret 2008.

#### 3.3. Definisi Operasional

Dalam penelitian ini, ada beberapa istilah yang harus dijelaskan secara jelas sehingga tidak menimbulkan salah persepsi dalam pemahamannya, antara lain:

- Degradasi secara *in vivo* adalah pemecahan suatu substansi melalui reaksi enzimatik oleh tubuh sehingga tidak terjadi akumulasi substansi tersebut di dalam tubuh.
- Tetraeter lipid adalah lipid hasil ekstraksi dari Archaea. Pada penelitian ini tetraeter lipid yang digunakan berasal dari *Thermoplasma acidophilum*.
- Liposom EPC-TEL 2,5 adalah liposom yang dikembangkan oleh Purwaningsih. Liposom ini merupakan kombinasi antara fosfatidilkolin yang berasal dari kuning telur (*Egg Yolk Phosphatidylcholine/EPC*) dan tetraeter lipid (TEL) dari *Thermoplasma acidophilum* dengan perbandingan 40:1 (jumlah mol TEL sebesar 2,5 persen dari jumlah mol EPC), yaitu 4 mmol EPC dan 0,1 mmol TEL.

- Injeksi intraperitoneal adalah injeksi di bagian kuadran bawah abdomen untuk memasukkan substansi ke dalam rongga peritoneal (rongga abdomen). Injeksi intraperitoneal pada penelitian ini dilakukan satu kali dengan volume pemberian sebesar 0,5 mL.
- *Retention factor (Rf)* adalah jarak yang ditempuh bercak dari titik awal dibagi jarak yang ditempuh eluen dari titik awal.
- Terdegradasi : jika pada kelompok perlakuan terdapat lebih banyak bercak (*Rf*) dibanding dengan kontrol + TEL dan gambaran yang sama tidak terlihat pada kontrol tanpa TEL .
- Tidak terdegradasi : apabila pada kelompok perlakuan, kontrol + TEL, dan kalibrasi terdapat gambaran bercak yang sama dan gambaran yang sama tidak terlihat pada kontrol tanpa TEL.

#### **3.4. Subjek Penelitian**

Subjek penelitian ini adalah mencit galur C3H jantan dan betina hasil *breeding* di Departemen Patologi Anatomik FKUI.

#### **3.5. Kriteria Inklusi**

Kriteria inklusi sampel yang akan digunakan adalah mencit galur C3H berusia 12-16 minggu dengan berat 18-25 gram dan dalam keadaan sehat.

#### **3.6. Besar Sampel**

Penelitian yang dilakukan oleh penulis merupakan bagian dari penelitian induk yang dilakukan oleh 5 orang peneliti. Kelima peneliti ini sama-sama meneliti mengenai degradasi TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 secara *in vivo* yang terbagi pada saat 30 menit, 1 jam, 2 jam, 4 jam, dan 8 jam setelah injeksi intraperitoneal liposom EPC-TEL 2,5 yang selanjutnya dibandingkan dengan kontrol. Berdasarkan penjelasan diatas, maka penelitian induk terdiri dari dengan 6 kelompok, yaitu:

1. Kelompok kontrol: injeksi larutan NaCl fisiologis secara intraperitoneal sebanyak 0,5 mL dan segera dimatikan.
2. Kelompok perlakuan 1 : injeksi liposom EPC-TEL 2,5 secara intraperitoneal sebanyak 0,5 mL dan dimatikan 30 menit setelah injeksi.

3. Kelompok perlakuan 2 : injeksi liposom EPC-TEL 2,5 secara intraperitoneal sebanyak 0,5 mL dan dimatikan 1 jam setelah injeksi.
4. Kelompok perlakuan 3 : injeksi liposom EPC-TEL 2,5 secara intraperitoneal sebanyak 0,5 mL dan dimatikan 2 jam setelah injeksi.
5. Kelompok perlakuan 4 : injeksi liposom EPC-TEL 2,5 secara intraperitoneal sebanyak 0,5 mL dan dimatikan 4 jam setelah injeksi.
6. Kelompok perlakuan 5 : injeksi liposom EPC-TEL 2,5 secara intraperitoneal sebanyak 0,5 mL dan dimatikan 8 jam setelah injeksi.

Besar sampel penelitian untuk penelitian induk dihitung dengan rumus Federer:

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

Keterangan:

n = jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t = jumlah kelompok perlakuan

Dari rumus di atas dapat dilakukan perhitungan besar sampel sebagai berikut:

t = 6, maka didapatkan:

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

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

$$(n-1) \geq 3$$

$$n \geq 4$$

Dari hasil perhitungan di atas, jumlah mencit yang akan dijadikan sampel dalam penelitian induk sebanyak 4 ekor untuk tiap kelompok dengan jumlah total 24 ekor mencit.

Kelima peneliti pada akan meneliti perbandingan degradasi TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 pada waktu yang berbeda. Pada kesempatan ini penulis meneliti perbandingan degradasi TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 (30 menit) yang selanjutnya disebut sebagai kelompok perlakuan. Karena penelitian yang dilakukan penulis

melibatkan 2 kelompok, maka mencit yang digunakan sebanyak 8 ekor dan dibagi secara acak dalam 2 kelompok. Kelompok kontrol yang digunakan pada penelitian ini merupakan bagian dari kelompok kontrol penelitian induk sehingga stabilitas biologik TEL tiap kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol yang sama.

### 3.7. Alat dan Bahan

#### 3.7.1 Bahan:

- Liposom EPC-TEL 2,5 (4 mmol EPC dan 0,1 mmol TEL)
- Mencit C3H
- Larutan Dapar PBS
- Eter
- Larutan NaCl 0,9%
- Metanol
- Etil asetat
- NaOH 0,01 M
- Kloroform
- Etanol
- Tembaga asetat 3% dan asam fosfat 8%,  
• dan gas N<sub>2</sub>.

#### 3.7.2 Alat:

- Set bedah minor
- Sarung tangan
- *Rotavapor-vacuum pump-waterbath Büchi*
- Alat sentrifugasi Sorvall Biofuge Primo
- Sduit Terumo 27G
- *Micropipette Socorex*
- *Microliter Syringes Hamilton*
- *Homogenizer Lurex*
- Kertas saring Whatman

- Lempeng KLT silica gel 60 F254 Merck
- Labu 250 mL,
- Tabung reaksi
- *Chamber*
- Pipet, timbangan gram, miligram, dan mikrogram Mettler AE 200
- *Scanner*,
- dan oven.

### 3.8. Cara Kerja <sup>6,7,18-20</sup>

Tiap kelompok pada penelitian induk memiliki 4 sampel mencit, maka pada pelaksanaannya dilakukan dalam 4 gelombang. Tiap gelombang terdiri dari 6 sampel yang merupakan perwakilan dari masing-masing kelompok sehingga kestabilan biologik TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 dapat diteliti dalam serial waktu yang berkelanjutan. Namun pada penelitian ini penulis hanya meneliti kelompok perlakuan 1 (30 menit) dan kelompok kontrol.

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian induk, maka pada pelaksanaannya terdapat prosedur kerja yang dilakukan bersamaan dengan peneliti lain yang berbeda kelompok perlakuannya. Metode yang dilakukan pada tiap gelombang meliputi beberapa tahapan, yaitu: preparasi liposom, preparasi hepar, ekstraksi hepar sesuai metode yang dilakukan Jonung dan kawan-kawan, preparasi kalibrasi, dan aplikasi dan *running* pada KLT. Berikut ini adalah rinciannya:

#### 3.8.1 Tahap I – Preparasi Liposom EPC-TEL 2,5

Preparasi liposom EPC-TEL 2,5 menurut metode yang dikembangkan oleh Purwaningsih:<sup>6</sup>

1. Labu ukuran 250 mL disiapkan yang sebelumnya telah dicuci dengan air tanpa sabun berulang kali, setelah itu dibilas dengan etanol teknis dan dikeringkan.
2. EPC dan TEL untuk liposom EPC-TEL 2,5 disiapkan dengan perbandingan 40:1, yaitu 4 mmol EPC dan 0,1 mmol TEL.
3. EPC disiapkan dengan perhitungan sebagai berikut:

1 mmol EPC = 0,78 mg EPC,

1 mencit membutuhkan 4 mmol EPC, sehingga untuk 1 ekor mencit dibutuhkan  $0,78 \text{ mg} \times 4 = 3,12 \text{ mg}$

Jumlah EPC minimal per gelombang dihitung berdasarkan ketentuan:

$$\text{jumlah sampel} + (\text{jumlah sampel} \times 10\%)$$

Yaitu:  $6 + (6 \times 10\%) \approx 7$  mencit. Selanjutnya ditentukan jumlah EPC per gelombang diambil untuk jumlah mencit 8 ekor, Maka jumlah EPC yang dibutuhkan per gelombang:

$$8 \text{ mencit} \times @ 3,12 \text{ mg} = 24,96 \text{ mg} \approx 25 \text{ mg}$$

4. TEL disiapkan dengan perhitungan sebagai berikut:

berat molekul TEL ~ 1488,4

1 mol = BM / L = 1488,4 g/L

1 mol = 1488,4 mg/mL

1 mmol = 1,4884 mg/mL

0,1 mmol = 0,14884 mg/mL

Jumlah TEL minimal per gelombang dihitung berdasarkan ketentuan:

$$\text{jumlah sampel} + (\text{jumlah sampel} \times 10\%)$$

Yaitu:  $6 + (6 \times 10\%) \approx 7$  mencit. Selanjutnya ditentukan jumlah TEL per gelombang diambil untuk jumlah mencit 8 ekor, Maka jumlah TEL yang dibutuhkan per gelombang:

$$8 \text{ mencit} \times @ 0,1 \text{ mmol} = 8 \times 0,14884 \text{ mg} = 1,1904 \text{ mg} \approx 1,2 \text{ mg}$$

5. EPC dan TEL sesuai perhitungan dimasukkan bersama butir pengaduk, dan campuran kloroform-etanol 1:1 sebanyak 10 mL ke dalam labu.
6. Labu diputar dengan Rotavapor buchi.
  - Mula-mula dengan kecepatan 2 strip dan tekanan 200 mBar
  - Setelah volume yang tersisa dalam labu menjadi setengah volume awal, kecepatan ditingkatkan sampai 3 strip dengan tekanan tetap.
  - Ketika cairan sudah mulai kering, tekanan diturunkan bertahap sampai 30-40 mBar dan dibiarkan selama  $\pm$  1 jam.
  - Saat butir pengaduk sudah tidak bergerak, biarkan selama 1-2 jam
  - Setelah liposom kering, rotavapor dimatikan. Sebelum dimatikan tekanan dinaikkan sampai 960 mBar, kecepatan diturunkan, kemudian dimatikan
7. Larutan dapar PBS dengan pH 7,4 disiapkan. PBS yang dibutuhkan yaitu 0,5 mL tiap mencit (per gelombang: 0,5mL x 8= 4mL).
8. PBS dimasukkan ke dalam tabung untuk melarutkan liposom.

### **3.8.2 Tahap II – Injeksi Liposom EPC-TEL 2,5 dan Preparasi Hepar**

1. Mencit diambil secara random sampling untuk kelompok perlakuan dan kelompok kontrol lalu diberi nomor.
2. Berat mencit ditimbang dan dicatat.
3. Liposom EPC-TEL 2,5 diinjeksikan pada mencit kelompok perlakuan secara intraperitoneal @ 0,5 mL dan waktu penyuntikan dicatat.
4. Placebo berupa 0,5 mL NaCl 0,9% diinjeksikan pada mencit kelompok kontrol secara intraperitoneal dan waktu penyuntikan dicatat.
5. Mencit dimatikan dengan sesuai waktu masing-masing kelompok, mencit pada kelompok kontrol segera dimatikan setelah dilakukan injeksi intraperitoneal larutan NaCl 0,9% sedangkan mencit kelompok perlakuan dimatikan 30 menit setelah injeksi intraperitoneal liposom EPC-TEL 2,5. Mencit dimatikan dengan cara yang memenuhi

persyaratan etika biomedik, yaitu mencit diletakkan ke dalam wadah khusus berisi kapas yang telah dibasahi oleh eter.

6. Hepar mencit diambil dengan cara membedah mencit dalam waktu kurang dari 10 menit.
7. NaCl 0,9 % diteteskan secukupnya pada hepar selama pembedahan.
8. Hepar ditimbang dan dicatat.
9. Sebanyak 200 mg diambil untuk tiap sampel, namun pada kelompok kontrol diambil dua potong dengan berat masing-masing 200 mg, satu potong untuk kontrol tanpa TEL dan satu potong lainnya untuk kontrol dengan penambahan TEL yang diberikan pada saat proses homogenasi atau ekstraksi hepar (selanjutnya disebut kontrol + TEL).
10. Hepar yang sudah dipotong tiap 200 mg dikemas dalam aluminium foil dan diberi label lalu disimpan dalam wadah berisi *dry ice* dan dimasukkan dalam *freezer*.

### **3.8.3 Tahap III – Ekstraksi Hepar (Jonung dan kawan-kawan)<sup>7</sup>**

1. Sebanyak 200 mg hepar yang telah diambil dihomogenasi dengan homogenizer Lurex.
2. Dua mL metanol disiapkan lalu diteteskan sedikit demi sedikit ke dalam homogenizer selama proses homogenasi.
3. Pada kontrol + TEL, sebanyak 0,5 mL liposom EPC-TEL 2,5 ditambahkan pada saat proses homogenasi atau ekstraksi hepar.
4. Hepar yang telah terhomogenasi disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.
5. Supernatan dan residu dari hasil sentrifugasi tersebut dipisahkan kemudian diberi label supernatan I dan residu I.
6. Residu I dihomogenasi.
7. Dua mL metanol disiapkan lalu diteteskan sedikit demi sedikit ke dalam homogenizer selama proses homogenasi pada residu I.
8. Residu I yang telah terhomogenasi disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.
9. Supernatan dan residu dari hasil sentrifugasi tersebut dipisahkan kemudian diberi label supernatan II dan residu II.

10. Supernatan I dan II dicampur kemudian dikeringkan dengan gas N<sub>2</sub>, selanjutnya hasilnya disebut residu III.
11. Residu III dilarutkan dengan 1,5 mL etil asetat dan 0,5 NaOH 0,01 M, yang selanjutnya disebut supernatan III.
12. Supernatan III disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit.
13. Supernatan dan residu dipisahkan kemudian diberi label supernatan IV dan residu IV.
14. Supernatan IV dan residu IV dikeringkan dengan gas N<sub>2</sub>, hasilnya disebut supernatan V dan residu V.

#### 3.8.4 Tahap IV – Preparasi Kalibrasi

1. Pada awalnya kalibrasi menggunakan TEL dengan konsentrasi 75 µg, 150 µg dan 300 µg, konsentrasi tersebut didapat dari perhitungan sebagai berikut:

TEL yang tersedia adalah 15,2 mg dalam 10,1 mL, maka

$$1 \text{ mL} = 15,2 \text{ mg} / 10,1 \text{ mL} = 1,504 \text{ mg/mL}$$

X = volume yang dibutuhkan

$$X / 1 \text{ mL} \times 1,504 \text{ mg} = 75 \text{ µg}$$

$$X / 1 \text{ mL} \times 1,504 \text{ mg} = 75 \text{ mg} \times 10^{-3}$$

$$X = 75 / 1,504 \text{ mL} \times 10^{-3}$$

$$X = 49,8670212 \text{ mL} \times 10^{-3}$$

$$X \approx 50 \text{ µL.}$$

Dapat disimpulkan bahwa tiap pengambilan 50 µL didapatkan konsentrasi TEL sebesar 75 µg. Karena pipet *Hamilton* yang tersedia mempunyai volume 50 µL, maka untuk mempermudah pengambilan dan meminimalisasi kesalahan, maka:

- untuk kalibrasi 75 µg dibutuhkan 50 µL.
- untuk kalibrasi 150 µg dibutuhkan 100 µL.

- untuk kalibrasi 300  $\mu\text{g}$  dibutuhkan 200  $\mu\text{L}$ .

Namun penggunaan kalibrasi diatas pada uji coba pendahuluan yang dilakukan sebelum penelitian memperlihatkan bercak TEL yang tipis pada lempeng KLT sehingga tidak terlihat jelas. Oleh karena itu konsentrasi TEL untuk kalibrasi ditingkatkan menjadi 100  $\mu\text{g}$ , 200  $\mu\text{g}$ , dan 300  $\mu\text{g}$  untuk memperjelas bercak TEL pada lempeng KLT, perhitungan kalibrasi 100  $\mu\text{g}$ , 200  $\mu\text{g}$ , dan 300  $\mu\text{g}$  adalah sebagai berikut:

Terdapat 90 mg TEL yang ditambahkan 4,5 mL Kloroform-Metanol 2:1.

X = volume yang dibutuhkan

$$X/4,5\text{mL} \times 90 \text{ mg} = 100 \mu\text{g}$$

$$X/4,5\text{mL} \times 90 \text{ mg} = 100 \text{ mg} \times 10^{-3}$$

$$X = 4,5 \text{ mL} \times 100 \text{ mg} \times 10^{-3} / 90 \text{ mg}$$

$$X = 5 \text{ mL} \times 10^{-3}$$

$$X \approx 5 \mu\text{L}.$$

Dapat disimpulkan bahwa tiap pengambilan 5  $\mu\text{L}$  didapatkan konsentrasi TEL sebesar 100  $\mu\text{g}$ . Untuk mempermudah pengambilan dan meminimalisasi kesalahan, maka:

- untuk kalibrasi 100  $\mu\text{g}$  dibutuhkan 5  $\mu\text{L}$ .
- untuk kalibrasi 200  $\mu\text{g}$  dibutuhkan 10  $\mu\text{L}$ .
- untuk kalibrasi 300  $\mu\text{g}$  dibutuhkan 15  $\mu\text{L}$ .

Namun sekali lagi, penggunaan kalibrasi diatas pada gelombang 4 walaupun hasilnya baik dinilai kurang cukup jelas sehingga diputuskan untuk meningkatkan konsentrasi kalibrasi menjadi 200  $\mu\text{g}$ , 300  $\mu\text{g}$ , dan 400  $\mu\text{g}$ ; perhitungannya adalah sebagai berikut:

150 mg TEL dalam 1 mL kloroform, maka jika diambil 0,1 mL didapat

0,1 mL = 15 mg, dengan penambahan 0,65 mL kloroform maka dalam 0,75 mL terdapat 15 mg TEL

X = volume

$$X/0,75\text{mL} \times 15 \text{ mg} = 200 \mu\text{g}$$

$$X/0,75\text{mL} \times 15 \text{ mg} = 200 \text{ mg} \times 10^{-3}$$

$$X = 200 \text{ mg} \times 10^{-3} \times 0,75 \text{ mL}/15 \text{ mg}$$

$$X = 10 \text{ mL} \times 10^{-3}$$

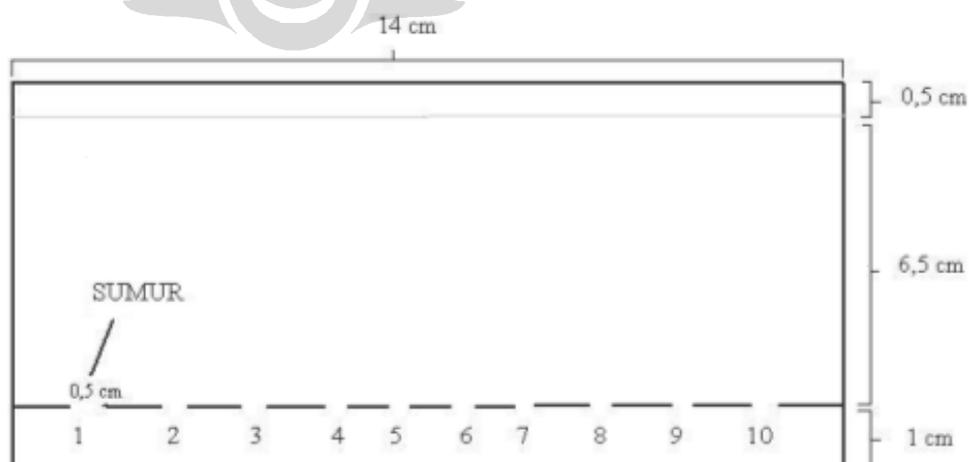
$$X \approx 10 \mu\text{L}.$$

Dapat disimpulkan bahwa tiap pengambilan 5  $\mu\text{L}$  didapatkan konsentrasi TEL sebesar 100  $\mu\text{g}$ . Untuk mempermudah pengambilan dan meminimalisasi kesalahan, maka:

- untuk kalibrasi 200  $\mu\text{g}$  dibutuhkan 10  $\mu\text{L}$ .
- untuk kalibrasi 300  $\mu\text{g}$  dibutuhkan 15  $\mu\text{L}$ .
- untuk kalibrasi 400  $\mu\text{g}$  dibutuhkan 20  $\mu\text{L}$ .

### 3.8.5 Tahap V – Aplikasi dan *Running* KLT

1. Aplikasi dan *running* KLT dilakukan bersamaan sebagai 1 gelombang dengan peneliti lain yang juga meneliti degradasi TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5 secara *in vivo*.
2. Lempeng KLT silica gel 60 F254 Merck dipanaskan terlebih dahulu.
3. Lempeng KLT silica gel 60 F254 Merck disiapkan dengan ukuran seperti dibawah ini.



Gambar 8. Model lempeng KLT silica gel yang digunakan

Keterangan:

- a. Sumur 1 : Kalibrasi 1\*
- b. Sumur 2 : Kalibrasi 2\*
- c. Sumur 3 : Kalibrasi 3\*
- d. Sumur 4 : Kontrol\*
- e. Sumur 5 : Kontrol + TEL\*
- f. Sumur 6 : Perlakuan 1 (30 menit)\*
- g. Sumur 7 : Perlakuan 2 (1 jam)
- h. Sumur 8 : Perlakuan 3 (2 jam)
- i. Sumur 9 : Perlakuan 4 (4 jam)
- j. Sumur 10: Perlakuan 5 (8 jam)

\* yang diteliti oleh penulis

4. Lempeng KLT dikeringkan dengan aliran udara panas (hairdrier).
5. Kalibrasi diaplikasikan pada lempeng KLT dengan menggunakan Microliter Syringes Hamilton sesuai dengan konsentrasi dan volume yang telah ditentukan diatas ke dalam sumur.
6. Supernatan V kelompok kontrol (kontrol tanpa TEL dan kontrol + TEL) dan kelompok perlakuan dilarutkan dengan 300  $\mu$ L kloroform-metanol 2:1.
7. Kontrol dan perlakuan dengan volume 20  $\mu$ L diaplikasikan menggunakan Microliter Syringes Hamilton ke dalam sumur pada lempeng KLT.
8. *Chamber* dan tutup dengan ukuran yang sesuai disiapkan sebagai wadah KLT.
9. Sebanyak 50 ml eluen kloroform-etanol disiapkan dengan perbandingan 9 : 1 (Purwaningsih<sup>7</sup>). Selanjutnya setelah dilakukan uji coba, tampak bercak TEL pada kalibrasi berada sangat dekat dengan batas akhir eluen sehingga menyulitkan pembacaan ( $R_f$  TEL mendekati 1). Oleh karena itu dilakukan pengurangan sifat non polar pada eluen agar nilai  $R_f$  TEL turun sehingga bercak TEL mudah dibaca dengan cara mengurangi jumlah kloroform pada campuran kloroform-

etanol menjadi 7 : 3 dan 6 : 4, ternyata yang paling baik adalah campuran kloroform-etanol dengan perbandingan 6 : 4.

10. Tembaga asetat 3% dan asam fosfat 8% disiapkan sebagai pewarna bercak.
11. Kertas saring dimasukkan ke dalam *chamber* dengan posisi diatur sedemikian rupa agar melapisi alas dan dinding *chamber*.
12. Eluen dimasukkan ke dalam *chamber* lalu tutup *chamber* dan tunggu hingga kertas saring menjadi jenuh.
13. Lempeng KLT dimasukkan kedalam *chamber*.
14. *Chamber* ditutup dengan rapat dan amati dengan seksama pergerakan eluen pada lempeng KLT .
15. KLT diangkat sheet ketika eluen telah mencapai garis akhir yang ditentukan.
16. Lempeng KLT dicelupkan ke dalam larutan perwarna bercak selama 10 detik.
17. Lempeng KLT dikeringkan pada suhu ruangan hingga kering.
18. Lempeng KLT dimasukkan ke dalam oven selama 10 menit dengan suhu 180° C yang sebelumnya sudah harus terkondisi pada suhu tersebut selama minimal 30 menit.
19. Lempeng KLT dikeluarkan dari dalam oven.
20. Lempeng KLT dipindai dengan menggunakan scanner.
21. Gambar yang diperoleh dari hasil pemindaian diolah dengan menggunakan program adobe photoshop 7.0.
22. Dilakukan analisis degradasi TEL melalui bercak pada lempeng KLT, yaitu dengan cara membandingkan bercak kelompok perlakuan dengan kontrol + TEL (dengan asumsi TEL pada kelompok kontrol + TEL tidak terdegradasi).
23. Melakukan uji statistik dengan menggunakan program SPSS.

### 3.9. Identifikasi Variabel

- Variabel bebas : durasi liposom EPC-TEL 2,5 pada mencit C3H.
- Variabel terikat : terdegradasi atau tidaknya TEL dalam liposom EPC-TEL 2,5.

Dalam menentukan variabel bebas, peneliti menggunakan skala nominal (nol menit, 30 menit). Untuk mengukur variabel terikat, peneliti menggunakan skala nominal (terdegradasi atau tidak).

### 3.10. Analisis Data

**Tabel 1: Langkah Analisis Data**

	Langkah	Jawaban
1	Variabel yang dihubungkan	Variabel yang dihubungkan adalah durasi liposom pada mencit (nominal) dan terdegradasi atau tidaknya TEL (nominal)
2	Jenis hipotesis	Komparatif
3	Masalah skala variable	Kategorik
4	Berpasangan / tidak berpasangan	Tidak berpasangan
5	Jenis tabel B x K	2 x 2
Kesimpulan: Jenis tabel pada penelitian ini adalah 2 x 2. Uji yang digunakan adalah uji <i>chi square</i> bila memenuhi syarat. Bila tidak memenuhi uji <i>chi square</i> , maka akan dilakukan dengan uji <i>Fisher</i> .		

### 3.11. Masalah Etika

Di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia sampai saat ini tidak terdapat komisi etik untuk hewan percobaan sehingga belum mendapat persetujuan etik dalam penggunaan mencit sebagai hewan coba.