

UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH pH URIN TERHADAP JUMLAH KUMULATIF
ASAM SALISILAT YANG DIEKSKRESIKAN MELALUI
SALURAN KEMIH PADA TIKUS PUTIH JANTAN YANG
DIBERIKAN ASETOSAL SECARA ORAL**

SKRIPSI

**HARDIANI RAHMANIA
0706264665**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM S1 FARMASI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH pH URIN TERHADAP JUMLAH KUMULATIF
ASAM SALISILAT YANG DIEKSKRESIKAN MELALUI
SALURAN KEMIH PADA TIKUS PUTIH JANTAN YANG
DIBERIKAN ASETOSAL SECARA ORAL**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi

HARDIANI RAHMANIA

0706264665

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM S1 FARMASI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Hardiani Rahmania

NPM : 0706264665

Tanda Tangan : 

Tanggal : 11 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Hardiani Rahmania
NPM : 0706264665
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Pengaruh pH Urin terhadap Jumlah Kumulatif Asam Salisilat yang Diekskresikan melalui Saluran Kemih pada Tikus Putih Jantan yang Diberikan Asetosal Secara Oral

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Drs. Umar Mansur, M.Sc. ()

Pembimbing II : Dra. Juheini Amin, M.Si. ()

Penguji I : Santi Purna Sari, S.Si., M.Si. ()

Penguji II : Dr. Arry Yanuar, M.Si. ()

Penguji III : Dr. Berna Elya, MS., Apt. ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 11 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT atas segala berkah dan rahmat-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Drs. Umar Mansur, M.Sc., selaku pembimbing I, yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, arahan dan solusi atas permasalahan yang terjadi selama masa penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Ibu Dra. Juheini Amin, M.Si., selaku pembimbing II, yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan dan kesabarannya menanggapi permasalahan yang terjadi selama masa penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI, yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini.
4. Ibu Dr. Dra. Berna Elya, Apt., M.S., selaku pembimbing akademis atas dukungan dan saran selama masa pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Ibu Santi Purna Sari, M.Si., atas bantuan, bimbingan, solusi, saran dan nasihat kepada saya selama penelitian ini dilakukan.
6. Seluruh staf pengajar, laboran dan karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu kelancaran dalam perkuliahan dan penelitian.
7. Mama Alm. Eka Maharani, Aba Ahmad Syukur, S.H., Adik Haritsah M.Z., Eyang Muslichah, B.A., serta seluruh keluarga besar yang telah mendukung

dengan penuh pengorbanan, doa, kasih sayang, dan perhatian yang begitu banyak.

8. Kakak Arreta Rei, M.Si., untuk semua perhatian, motivasi, dan bantuan di kala suka dan duka selama penelitian dan penyusunan skripsi.
9. Teman-teman penelitian Farmakologi : Ummi, Diah, Diandra, DR, Anita, Nurul, Nurli, Wulan, Kak Nisa, Kak Dewi, Kak Fitri, Kak Gina, Kak Silvi, Mbak Ida, yang banyak membantu dan menemani selama masa penelitian.
10. Teman-teman Farmasi angkatan 2007, khususnya sahabat-sahabatku Mega, Isna, Ifthah, Mutia, Piwi, Ninin, terima kasih atas waktu dan kebersamaan kita, semoga kedepannya kita semua dapat meraih kesuksesan.
11. Teman-teman tim PKMP 2011: Melati, Evan, Yakub, Ady, Ani, Ole, dan Mbak Gati atas semangat untuk terus berkarya yang diberikan kepada saya.
12. Teman-teman Pondok Putri Kania, ADZEM, GAMIS 61, Musholla 'Izzatul Islam dan HMD Farmasi, terima kasih karena aktivitas bersama kalian mengingatkan bahwa hidup bukan hanya untuk diri sendiri dan bukan hanya di dunia.
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu yang telah memberikan bantuan hingga terselesaikannya penyusunan skripsi ini.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi para pembaca dan perkembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Hardiani Rahmania
NPM : 0706264665
Program Studi : S1
Departemen : Farmasi
Fakultas : MIPA
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Pengaruh pH Urin terhadap Jumlah Kumulatif Asam Salisilat yang Diekskresikan melalui Saluran Kemih pada Tikus Putih Jantan yang Diberikan Asetosal Secara Oral

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 11 Juli 2011

Yang menyatakan



(Hardiani Rahmania)

ABSTRAK

Nama : Hardiani Rahmania
Program studi : Farmasi
Judul : Pengaruh pH Urin terhadap Jumlah Kumulatif Asam Salisilat yang Diekskresikan melalui Saluran Kemih pada Tikus Putih Jantan yang Diberikan Asetosal Secara Oral

Asetosal merupakan obat analgesik antipiretik dan antiinflamasi yang memiliki efek samping ulserasi mukosa lambung. Untuk memperpanjang durasi asetosal sehingga mengurangi efek sampingnya, perlu dilakukan peningkatan waktu paruh asetosal. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pH urin (6,82 - 10,10) terhadap waktu paruh asetosal yang ditunjukkan dengan jumlah kumulatif asam salisilat yang diekskresikan. Pada penelitian ini digunakan 25 ekor tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley* yang terbagi dalam 5 kelompok, yaitu kontrol normal, hanya diberi larutan CMC 0,5% yang mengandung gliserol 15%; kontrol asetosal (216 mg/200 g berat badan); dan tiga kelompok yang diberi asetosal (216 mg/200 g berat badan) serta larutan NaHCO₃ 10% tiap 6 jam dengan variasi dosis yang telah dipilih (180; 270; 360 mg/200 g berat badan). Semua larutan uji diberikan secara oral. Kadar asam salisilat diukur pada cuplikan urin jam ke-1, 2, 3, 4, 5, dan 10 dengan cara mereaksikan dengan besi (III) amonium sulfat sehingga terbentuk kompleks besi (III) salisilat berwarna ungu yang diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada pH urin yang semakin basa, terjadi peningkatan jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin, sehingga waktu paruh asetosal semakin menurun.

Kata kunci : asam salisilat dalam urin, asetosal, pH urin, waktu paruh
xiv + 77 halaman; 22 gambar; 16 tabel; 7 lampiran
Daftar Pustaka : 36 (1964-2010)

ABSTRACT

Name : Hardiani Rahmania
Program study: Pharmacy
Title : The Effect of Urine pH on Cumulative Amount of Salicylic Acid which is Excreted Passes Through Urinary Tract on Male Albino Rats that Given Acetosal Orally

Acetosal is an antipyretic analgesic and anti-inflammatory drug that has side effects gastric mucosal ulceration. To extend the duration acetosal thereby reducing side effects is necessary to improve half-life acetosal. This research was subjected to determine the effect of urine pH (6,8 - 10,10) against half-life acetosal indicated by the cumulative amount of salicylic acid which is excreted. In this research used 25 male albino rats of *Sprague-Dawley* strain which is divided into 5 groups, that are normal controls who were given only 0.5% CMC solution containing 15% glycerol, acetosal control (216 mg/200 g body weight), and three groups were given acetosal (216 mg/200 g body weight) and NaHCO₃ 10% solution every 6 hours with variation doses which was selected (180; 270; 360 mg/200 g body weight). All test solutions administered orally. Salicylic acid concentration in urine samples were measured on 1, 2, 3, 4, 5, and 10 hours by reacting with iron (III) ammonium sulphate, forming complexes of iron (III) salicylate purple measured absorbance using UV-Vis spectrophotometer. The results showed that the urine pH more alkaline, cumulative total amount of salicylic acid in urine was increasing, so the acetosal half-life became faster.

Keywords : salicylic acid in urine, acetosal, urine pH, half-life
xiv + 77 pages ; 22 figures; 16 tables; 7 appendices
References : 36 (1964-2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
1.3 Hipotesis	2
2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Asetosal.....	3
2.1.1 Monografi	3
2.1.2 Mekanisme kerja dan efek samping	3
2.1.3 Farmakokinetika dan farmakodinamika.....	6
2.1.4 Indikasi, sediaan, posologi, dan kontraindikasi	7
2.1.5 Pengukuran kadar asetosal (asam salisilat)	9
2.2 Ekskresi Obat Melalui Ginjal.....	9
2.2.1 Mekanisme.....	9
2.2.2 Analisis obat dalam urin	11
2.3 Agen Alkalinisasi dan Asidisasi pH Urin.....	13
2.3.1 Agen alkalinisasi pH urin	14
2.3.2 Agen asidisasi pH urin	15
2.4 Validasi Metode Analisis	16
2.4.1 Kecermatan (<i>accuracy</i>).....	17
2.4.2 Keseksamaan (<i>precision</i>).....	17
2.4.3 Uji perolehan kembali (<i>recovery</i>).....	17
2.4.4 Selektivitas (spesifisitas).....	18
2.4.5 Linearitas dan rentang	18
2.4.6 Batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ)	19
3. METODE PENELITIAN	20
3.1 Lokasi.....	20
3.2 Bahan	20
3.3 Alat.....	20
3.4 Cara Kerja	21
3.4.1 Persiapan hewan uji.....	21

3.4.2 Penetapan dosis	21
3.4.3 Penyiapan bahan uji, agen alkalinisasi urin dan larutan pereaksi	22
3.4.4 Uji pendahuluan.....	24
3.4.5 Pelaksanaan percobaan	26
3.4.6 Analisis asam salisilat dalam urin	28
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Uji Pendahuluan.....	32
4.1.1 Uji urinasi pada tikus.....	32
4.1.2 Uji asidisasi dan alkalinisasi urin pada tikus	32
4.1.3 Uji metode analisis dan stabilitas asam salisilat dalam urin secara in vitro	33
4.2 Analisis Asam Salisilat dalam Urin.....	34
4.2.1 Pembuatan spektrum serapan	34
4.2.2 Kurva kalibrasi asam salisilat dalam urin	34
4.3 Pengukuran pH Urin Setiap Cuplikan dari Semua Kelompok Perlakuan .	36
4.4 Data Cuplikan Urin.....	37
4.4.1 Tinjauan waktu paruh asetosal	38
4.4.2 Tinjauan jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin	39
4.5 Validasi Metode Analisis Asam Salisilat dalam Urin.....	41
4.5.1 Uji kecermatan.....	41
4.5.2 Uji perolehan kembali	41
4.5.3 Linearitas dan rentang	41
4.5.4 Batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ)	42
4.6 Uji Statistik terhadap Jumlah Kumulatif Asam Salisilat yang Diekskresikan dalam Urin.....	42
5. KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1 Kesimpulan	43
5.2 Saran.....	43
DAFTAR ACUAN.....	44

DAFTAR GAMBAR

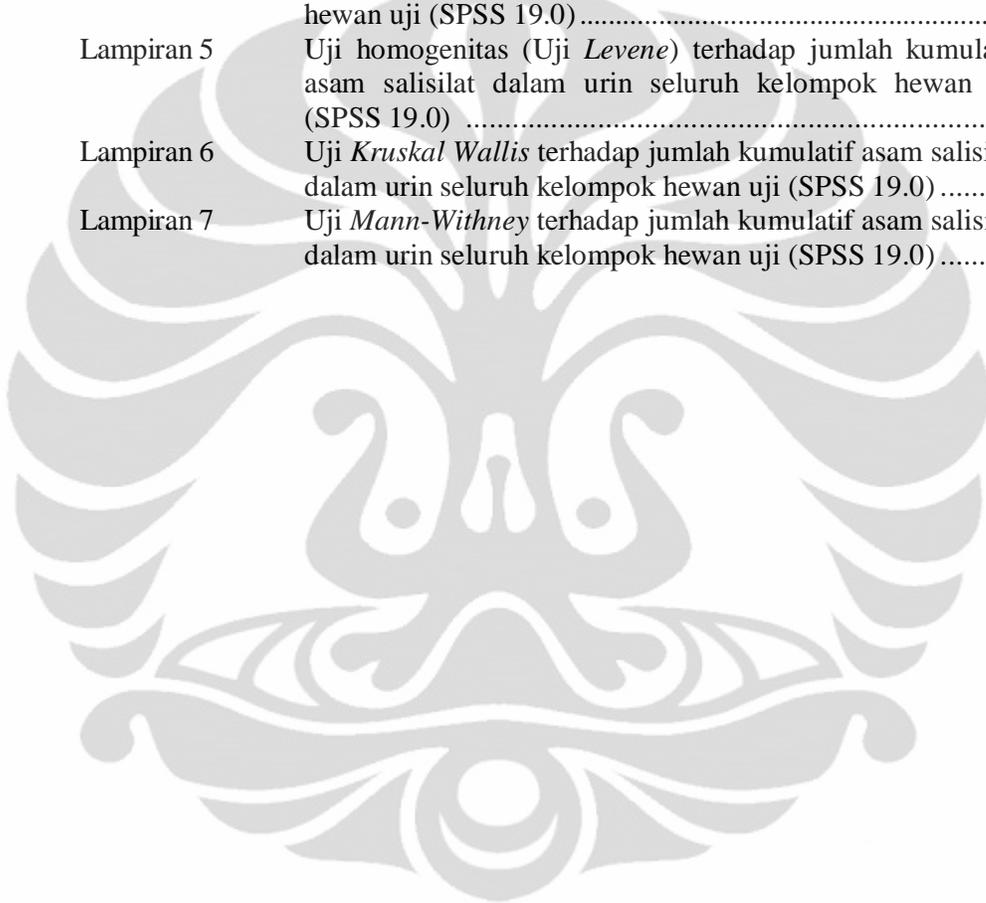
Gambar 2.1	Rumus struktur Asetosal.....	3
Gambar 2.2	Biosintesis prostaglandin.....	4
Gambar 2.3	Reaksi pembentukan kompleks warna besi (III) salisilat	8
Gambar 2.4	Grafik semilogaritmik persamaan 2.2.2.3	12
Gambar 2.5	Struktur kimia (a) asam sitrat dan (b) kalium sitrat	14
Gambar 2.6	Struktur kimia asam askorbat.....	16
Gambar 4.1	Spektrum serapan asam salisilat dalam urin in vivo.....	34
Gambar 4.2	Kuva kalibrasi asam salisilat dalam urin	35
Gambar 4.3	Grafik pH rata-rata cuplikan urin dari semua kelompok perlakuan	37
Gambar 4.4	Grafik semilog rata-rata kelompok kontrol asetosal.....	38
Gambar 4.5	Grafik semilog rata-rata kelompok asetosal pada pH urin basa I.....	38
Gambar 4.6	Grafik semilog rata-rata kelompok asetosal pada pH urin basa II.....	38
Gambar 4.7	Grafik semilog rata-rata kelompok asetosal pada pH urin basa III	38
Gambar 4.8	Grafik perbandingan jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin terhadap waktu pada tiap kelompok perlakuan.....	40
Gambar 4.9	Grafik jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin terhadap pH urin rata-rata pada jam ke-10.....	40
Gambar 3.1	Tikus <i>Sprague Dawley</i> berumur 4 bulan	48
Gambar 3.2	pH meter (Eutech Instrument pH 510)	48
Gambar 3.3	Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1601)	48
Gambar 3.4	<i>Sentrifugator</i> (Kubota 5100)	49
Gambar 3.5	Bagian dalam <i>sentrifugator</i> (Kubota 5100)	49
Gambar 3.6	Kandang metabolisme.....	49

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Hubungan konsentrasi salisilat dalam darah dengan efek terapi dan efek toksik	5
Tabel 2.2	Pengaruh pH urin dan pKa pada ionisasi obat	11
Tabel 3.1	Pembagian kelompok hewan uji	27
Tabel 4.1	Data kurva kalibrasi asam salisilat dalam urin	35
Tabel 4.2	pH urin rata-rata setiap cuplikan dari semua kelompok perlakuan	36
Tabel 4.3	Data pH cuplikan urin pada kelompok kontrol asetosal	50
Tabel 4.4	Data pH cuplikan urin pada kelompok asetosal pada pH urin basa I	50
Tabel 4.5	Data pH cuplikan urin pada kelompok asetosal pada pH urin basa II	51
Tabel 4.6	Data pH cuplikan urin pada kelompok asetosal pada pH urin basa III	51
Tabel 4.7	Data cuplikan urin kelompok kontrol asetosal	52
Tabel 4.8	Data cuplikan urin kelompok asetosal pada pH urin basa I	54
Tabel 4.9	Data cuplikan urin kelompok asetosal pada pH urin basa II	56
Tabel 4.10	Data cuplikan urin kelompok asetosal pada pH urin basa III	58
Tabel 4.11	Data uji kecermatan larutan asam salisilat dalam urin	60
Tabel 4.12	Data uji perolehan kembali larutan asam salisilat dalam urin	60
Tabel 4.13	Data pengukuran LOD dan LOQ larutan asam salisilat dalam urin ..	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat keterangan tikus <i>Sprague Dawley</i>	62
Lampiran 2	Sertifikat analisis Asetosal	63
Lampiran 3	Cara perhitungan validasi metode analisis	64
Lampiran 4	Uji normalitas (Uji <i>Saphiro-Wilk</i>) terhadap jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji (SPSS 19.0)	65
Lampiran 5	Uji homogenitas (Uji <i>Levene</i>) terhadap jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji (SPSS 19.0)	69
Lampiran 6	Uji <i>Kruskal Wallis</i> terhadap jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji (SPSS 19.0)	71
Lampiran 7	Uji <i>Mann-Withney</i> terhadap jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji (SPSS 19.0)	73



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obat dieliminasi dari tubuh melalui proses ekskresi ginjal dan metabolisme hati. Ekskresi ginjal merupakan jalur eliminasi terbesar untuk beberapa obat. Ada tiga proses yang terlibat pada ekskresi ginjal yakni, filtrasi glomerulus, sekresi aktif di tubular proksimal, dan reabsorpsi di sepanjang tubulus. Proses reabsorpsi obat-obat yang bersifat asam lemah atau basa lemah dipengaruhi oleh pKa obat dan pH urin. Kedua faktor tersebut merupakan faktor penentu persentase obat terionisasi atau tidak terionisasi. Nilai pKa obat merupakan faktor yang bersifat tetap, sedangkan pH urin dapat berubah bergantung pada pola makan, keadaan fisiologis yang tidak normal, dan konsumsi obat. Obat yang tidak terionisasi pada urin, akan lebih larut dalam lemak, sehingga dengan mudah direabsorpsi kembali ke dalam tubuh, namun jika ionisasi obat meningkat pada urin, obat akan sedikit larut dalam lemak dan reabsorpsinya akan berkurang. Proses reabsorpsi obat dapat mempengaruhi banyaknya obat yang diekskresi sehingga berkaitan dengan waktu paruh obat (Hollenberg, 2005; Setiawati, Suyatna, dan Gan, 2007; Shargel dan Yu, 1985).

Asetosal merupakan analgesik paling lama digunakan (sejak tahun 1899), dan sampai saat ini paling banyak digunakan di seluruh dunia. Obat ini juga berkhasiat antipiretik yang paling efektif dan paling aman (Alfonso, 1990). Asetosal juga merupakan obat utama yang digunakan pada penatalaksanaan beberapa penyakit rematik karena sifat analgesik dan antiinflamasinya. Selain itu asetosal juga menghambat agregasi trombosit, serta digunakan untuk pencegahan infark miokardial, *stroke* setelah serangan kekurangan darah sementara di otak (TIA / *Transient Ischaemic Attack*). Penggunaan asetosal tersebut sering menimbulkan efek samping yaitu ulserasi mukosa lambung yang berisiko terjadinya perdarahan samar (Drug Facts and Comparisons Pocket Version, 2007; Lacy, Armstrong, Goldman, dan Lance, 2005; AMA Department of Drugs, 1973).

Asetosal diekskresikan dalam bentuk inaktif yaitu asam salisilat dan bentuk aktif asam salisilat. Pada penelitian terdahulu diketahui bahwa jumlah asam salisilat yang diekskresikan dalam urin bervariasi tergantung pH urin (Rashid, Bhatti, Hanif, dan Ahmad, 2006). Oleh karena itu, pada penelitian ini ingin dilihat apakah jumlah kumulatif asam salisilat yang diekskresikan ke dalam urin tergantung pH urin atau tidak, yang nantinya akan berkaitan waktu paruh eliminasi asetosal dari tubuh. Jika waktu paruhnya meningkat pada pH urin tertentu, durasi kerja asetosal menjadi lebih panjang, sehingga frekuensi penggunaannya tidak sering dan efek sampingnya menjadi berkurang, namun jika waktu paruhnya menurun pada pH urin tertentu, penggunaannya menjadi semakin sering dan efek sampingnya menjadi bertambah parah.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah pH urin berpengaruh terhadap waktu paruh asetosal yang ditunjukkan dengan jumlah kumulatif asam salisilat yang diekskresikan melalui saluran kemih pada tikus putih jantan yang diberikan asetosal secara oral.

1.3 Hipotesis

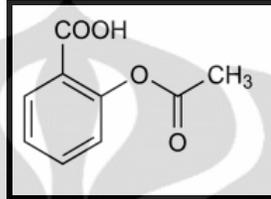
Jumlah kumulatif asam salisilat yang diekskresikan dipengaruhi oleh pH urin pada tikus putih jantan yang diberikan asetosal secara oral.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asetosal

2.1.1 Monografi



Gambar 2.1 Rumus struktur Asetosal

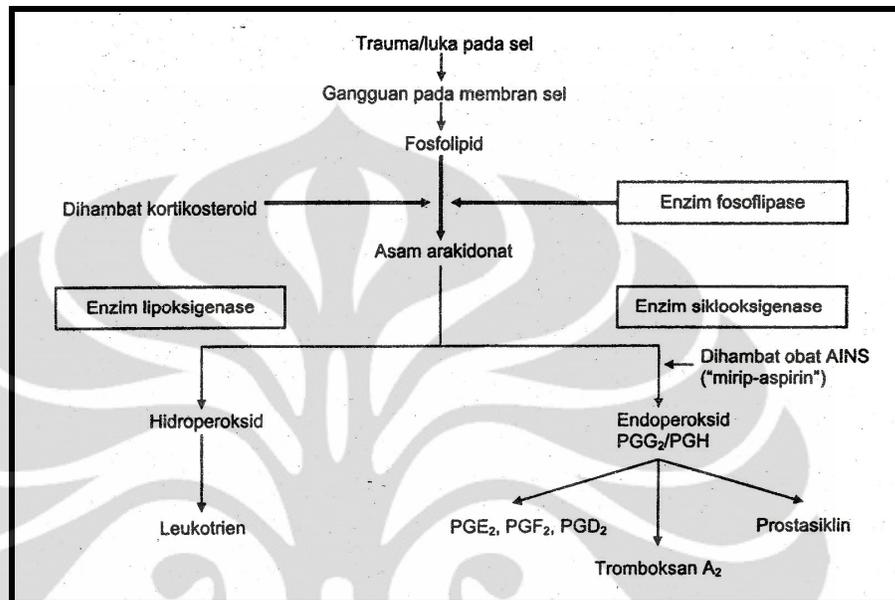
Asetosal dengan rumus molekul $C_9H_8O_4$ memiliki berat molekul 180,16 g/mol. Sinonim dari asetosal adalah asam asetilsalisilat; asam asetat salisilat; aspirin. Pemerian asetosal yaitu berupa hablur putih, umumnya seperti jarum atau lempengan tersusun, tidak berbau atau berbau lemah. Asetosal stabil di udara kering, sedangkan di udara lembab secara bertahap terhidrolisis menjadi asam salisilat dan asam asetat. Titik leleh obat ini yaitu pada suhu 135° . Obat ini larut dalam 300 bagian air, 5 bagian etanol, 17 bagian kloroform, dan 10-15 bagian eter; larut dalam larutan asetat, sitrat, alkali hidroksida, dan karbonat; agak sukar larut dalam eter mutlak. Nilai pKa asetosal yaitu 3,5 (25°). Spektrum UV asetosal yaitu dalam larutan asam pada panjang gelombang 230; 278 nm; dan dalam larutan basa pada panjang gelombang 231; 298 nm (Alfonso, 1990; Farmakope Indonesia Ed. ke-4, 1995; Galichet, Moffat, Osselton, dan Widdop, 2005).

Asetosal sukar larut dalam air, maka dalam penelitian ini asetosal diberikan dalam bentuk suspensi oral. Suspensi ini dibuat baru sebelum diberikan pada tikus karena asetosal terhidrolisis secara bertahap menjadi asam salisilat dan asam asetat saat kontak dengan udara lembab / yang mengandung air (Galichet, Moffat, Osselton, dan Widdop, 2005).

2.1.2 Mekanisme kerja dan efek samping

Mekanisme kerja asetosal berhubungan dengan biosintesis prostaglandin. Vane dkk melaporkan pada tahun 1971 bahwa secara in vitro obat-obat AINS

(Antiinflamasi Nonsteroid) termasuk asetosal menghambat produksi enzimatik dari prostaglandin. Selanjutnya terbukti produksi prostaglandin meningkat bila sel mengalami kerusakan (Wilmana dan Gan, 2007).



Gambar 2.2 Biosintesis prostaglandin

Obat ini menghambat enzim siklooksigenase sehingga konversi asam arakidonat menjadi PGG_2 terganggu. Enzim siklooksigenase (COX) terdapat dalam 2 isoform yaitu COX-1 dan COX-2. Umumnya COX-1 penting dalam pemeliharaan berbagai fungsi dalam kondisi normal di berbagai jaringan khususnya ginjal, saluran cerna, dan trombosit. COX-2 ini diinduksi berbagai stimulus inflamatoar, termasuk sitokin, endotoksin dan *growth factors*. Tromboksan A_2 , yang disintesis trombosit oleh COX-1, menyebabkan agregasi trombosit, vasokonstriksi dan proliferasi otot polos. Sebaliknya prostasiklin (PgI_2) yang disintesis oleh COX-2 di endotel makrovaskular melawan efek tersebut dan menyebabkan agregasi trombosit, vasodilatasi dan efek anti-proliferaatif yang kemudian menjadi edema dan inflamasi. Asetosal 166 kali lebih kuat menghambat COX-1 daripada COX-2 (Vane dan Botting, 2003; Holtzman dan Sung, 2005; Wilmana dan Gan, 2007).

Efek antiinflamasi dihasilkan dari kemampuan asetosal menghambat sintesis prostaglandin dan tromboksan A_2 . Asetosal menghambat perlekatan

granulosit ke pembuluh darah yang rusak, menstabilkan lisosom, dan menghambat migrasi leukosit polimorfonuklear dan makrofag ke tempat peradangan. Efek analgesik dihasilkan dari kerjanya secara perifer melalui efeknya atas peradangan, tetapi mungkin juga menekan rangsang nyeri di tingkat subkorteks. Efek antipiretik berhubungan dengan peningkatan pengeluaran panas karena pelebaran pembuluh darah superfisial. Asetosal juga menghambat demam yang menyertai infeksi akibat pembentukan prostaglandin. Efeknya terhadap trombosit adalah perpanjangan waktu perdarahan akibat penghambatan agregasi trombosit sekunder karena penghambatan sintesis tromboksan A₂ (Shearn, 1986).

Efek samping yang paling sering terjadi akibat penggunaan asetosal adalah terjadinya iritasi mukosa lambung dengan risiko tukak lambung dan perdarahan samar (*occult*) karena sifat asam dari asetosal. Pada dosis besar, efek samping yang terjadi adalah hilangnya efek pelindung dari prostasiklin (P_gI₂) terhadap mukosa lambung, yang sintesisnya turut dihalangi akibat blokade siklo-oksigenase. Selain itu, asetosal dapat menimbulkan reaksi alergi kulit dan *tinitus* (telinga berdengung) pada dosis lebih tinggi. Efek yang lebih serius adalah kejang-kejang bronki hebat terutama pada pasien asma, meski dalam dosis kecil. Pada anak-anak kecil yang menderita cacar air atau flu/salesma jika diberikan asetosal dapat berisiko terkena Sindrom *Reye* (Lacy, Armstrong, Goldman, dan Lance, 2005; Holtzman dan Sung, 2005).

Tabel 2.1 Hubungan konsentrasi salisilat dalam darah dengan efek terapi dan efek toksik

Konsentrasi Salisilat dalam darah (µg/ml)	Efek	Konsekuensi
50-100	Analgesik, antipiretik	
150-300	Antiinflamasi	
200-350	Salisilism	<i>Tinitus</i> , pusing, mual
≤350	Hiperventilasi	Alkalosis respiratorik
450-800	Gangguan metabolisme karbohidrat, berkeringat, muntah, fosforilasi oksidatif terputus, depresi pernapasan, meningkatnya asidosis dan temperatur tubuh	Asidosis metabolik, dehidrasi, hipertermia, asidosis respiratorik, delirium, konvulsi, dan koma

[Sumber: Brody's Human Pharmacology: Molecular to Clinical (Ed. ke-4), 2005]

2.1.3 Farmakokinetika dan farmakodinamika

Asetosal memiliki bioavailabilitas oral yang baik, yaitu berkisar 80-100% dan terdistribusi ke seluruh tubuh dengan volume distribusi 10 liter, sehingga ditemukan dalam cairan sinovial, cairan spinal, cairan peritoneal, liur dan air susu. Bioavailabilitas obat ini dipengaruhi bentuk sediaan, keberadaan makanan, waktu pengosongan lambung, pH lambung, keberadaan antasid, agen pendapar, dan ukuran partikel. Obat ini memiliki pKa yang rendah sehingga asetosal akan diabsorpsi dengan baik pada lingkungan asam di lambung. Waktu paruh plasma obat ini hanya 15 menit, karena obat ini cepat terhidrolisis menjadi asam salisilat yang memiliki efek terapi yang sama dengan asetosal. Waktu paruh asam salisilat adalah 2-3 jam pada dosis 1-3 g/hari (Drug Facts and Comparisons Pocket Version, 2007; Lacy, Armstrong, Goldman, dan Lance, 2005; Holtzman dan Sung, 2005; Wilmana dan Gan, 2007). Durasi obat ini sekitar 4-6 jam. Untuk mencapai kadar puncak pada serum kira-kira selama 1-2 jam. Dalam hati, sekitar 75% zat ini terkonjugasi dengan glisin menjadi bentuk inaktif yaitu asam salisilat, yang diekskresikan melalui ginjal, bersama-sama dengan konjugat glukoronida (5%), asam gentisat (<1%) dan 10% asam salisilat bebas. Pada pH urin yang bersifat basa, asam salisilat bebas dapat diekskresikan sampai dengan 30%. Terbatasnya glisin hepatik dan glukoronida yang tersedia untuk konjugasi menyebabkan eliminasi salisilat terjadi dengan kinetika orde satu pada dosis rendah dan kinetika orde nol pada dosis tinggi. Perhitungan ini digunakan untuk meningkatkan waktu paruh dengan peningkatan dosis (Lacy, Armstrong, Goldman, dan Lance, 2005; Holtzman dan Sung, 2005; Haretwing-Otto, 1983).

Sebagai analgesik, asetosal hanya efektif terhadap nyeri dengan intensitas rendah sampai sedang, juga efektif terhadap nyeri yang berkaitan dengan inflamasi, serta tidak menimbulkan ketagihan dan efek samping sentral yang merugikan. Sebagai antipiretik, asetosal akan menurunkan suhu badan hanya pada keadaan demam, namun obat ini bersifat toksik jika digunakan secara rutin dan waktu yang terlalu lama. Pada keadaan toksik justru memperlihatkan adanya efek piretik yaitu terjadinya demam dan hiperhidrosis. Sebagai antiinflamasi, obat ini hanya meringankan gejala nyeri dan inflamasi yang berkaitan dengan penyakitnya secara simtomatik, tidak menghentikan, memperbaiki, atau mencegah kerusakan

jaringan. Pada penyakit demam rematik, asetosal masih menjadi pilihan utama yang belum dapat digantikan dengan AINS lain (Wilmana dan Gan, 2007). Efek asetosal terhadap trombosit yaitu asetosal memperpanjang waktu perdarahan. Hal ini dikarenakan penghambatan agregasi trombosit akibat penghambatan tromboksan (Alfonso, 1990; Shearn, 1986).

2.1.4 Indikasi, sediaan, posologi, dan kontraindikasi

Asetosal termasuk obat analgesik-antipiretik antiinflamasi nonsteroid dari derivat asam salisilat (Wilmana dan Gan, 2007). Obat ini mampu meringankan atau menghilangkan rasa nyeri, tanpa mempengaruhi sistem saraf pusat atau menurunkan kesadaran, tidak menimbulkan ketagihan, juga berkhasiat ant demam kuat dan antiradang. Pada dosis rendah dapat menghambat agregasi trombosit. Asetosal dewasa ini banyak digunakan sebagai alternatif dari antikoagulan sebagai obat pencegah infark kedua setelah terjadi serangan. Obat ini juga efektif untuk profilaksis infark miokardial, serangan stroke kedua setelah menderita TIA (*Transient Ischaemic Attack* = serangan kekurangan darah sementara di otak), terutama pada pria. Obat ini juga digunakan pada penanganan beberapa penyakit rematik (AMA Department of Drugs, 1973; Drug Facts and Comparisons Pocket Version, 2007; Lacy, Armstrong, Goldman, dan Lance, 2005).

Dosis umum asetosal yaitu 1,2-4 g sehari (Galichet, Moffat, Osselton, dan Widdop, 2005). Asetosal pada nyeri dan demam diberikan secara oral 4 kali sehari 325-600 mg setelah makan, maksimum 4 g sehari (Drug Facts and Comparisons Pocket Version, 2007; Lacy, Armstrong, Goldman, dan Lance, 2005; Wilmana dan Gan, 2007). Untuk efek antiplatelet berkisar dari 3-5 mg/kg/hari sampai 5-10 mg/kg/hari diberikan dalam dosis tunggal per hari. Untuk pencegahan infark miokardial, dosisnya 75-325 mg/hari. Untuk infark miokardial akut dan *stroke* akut, dosis yang digunakan 160-325 mg/hari. Untuk pencegahan *stroke*/TIA: 30-325 mg/hari (Drug Facts and Comparisons Pocket Version, 2007; Lacy, Armstrong, Goldman, dan Lance, 2005).

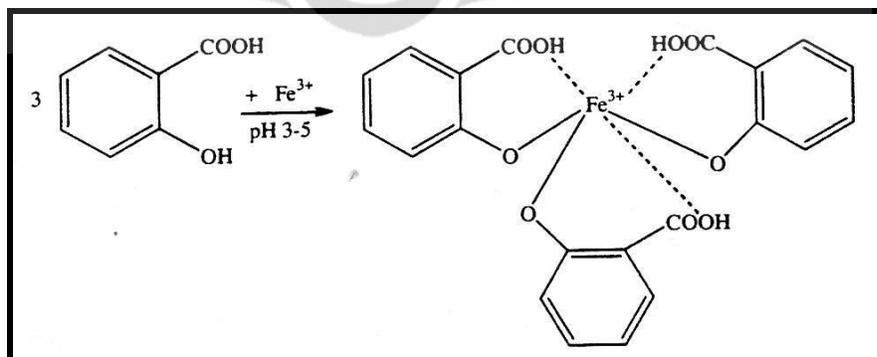
Asetosal tersedia dalam bentuk tablet 100 mg untuk anak dan tablet 500 mg untuk dewasa (Wilmana dan Gan, 2007). Asetosal juga tersedia dalam bentuk kapsul 300 mg; tablet 60, 75, 150, 300, 500 mg; tablet salut 300, 600 mg (AMA

Department of Drugs, 1973). Ada pula sediaan tablet kunyah 81 mg; tablet salut 325 mg; tablet lepas lambat 650 mg; tablet lepas terkendali 800 mg (Drug Facts and Comparisons Pocket Version, 2007).

Asetosal dikontraindikasikan untuk pasien dengan hipersensitivitas terhadap salisilat; anak di bawah usia 12 tahun menderita cacar air atau flu/salesma dan anak yang sedang disusui karena berisiko terkena Sindrom *Reye*. Asetosal tidak cocok untuk anak dengan penyakit ringan; ulserasi saluran cerna; hemophilia; gout; asma; *rhinitis*; polip. Asetosal juga dikontraindikasikan pada pasien yang menderita hemophilia, ulser perdarahan, dan kelainan perdarahan. Asetosal termasuk obat kategori D, yang terbukti menyebabkan meningkatnya kejadian malformasi janin pada manusia atau menyebabkan kerusakan janin yang bersifat ireversibel, sehingga penggunaannya dihindari selama kehamilan, terutama pada trisemester ketiga (Sukandar, Andrajati, Sigit, Adnyana, Setiadi, dan Kusnandar, 2008; Drug Facts and Comparisons Pocket Version, 2007; Holtzman dan Sung, 2005).

2.1.5 Pengukuran kadar asetosal (asam salisilat)

Dalam urin, asetosal diekskresikan sebagai metabolit asam salisilat (75%) dan obat aktif yaitu asam salisilat (10%). Dalam penelitian ini yang diukur kadarnya dalam urin adalah asam salisilat dengan metode kolorimetri. Pengukuran asam salisilat dilakukan dengan cara mereaksikan dengan Fe^{3+} sehingga terbentuk kompleks besi (III) salisilat berwarna ungu yang dapat diukur serapannya secara spektrofotometri UV-Vis (Borer dan Barry, 2000; Sudjadi, 2004).



[Sumber: Analisis Obat dan Makanan, 2004]

Gambar 2.3 Reaksi pembentukan kompleks warna besi (III) salisilat

2.2 Ekskresi Obat Melalui Ginjal

2.2.1 Mekanisme (Setiawati, Farmakokinetik Klinik, 2007; Shargel dan Yu, 1985; Hollenberg, 2005)

Ekskresi ginjal merupakan rute terbesar eliminasi untuk beberapa obat. Obat-obat yang larut air, mempunyai berat molekul rendah ($BM \leq 300$), atau yang mengalami biotransformasi secara lambat oleh hati akan dieliminasi dengan ekskresi ginjal. Proses ekskresi obat oleh ginjal meliputi 3 proses, yaitu filtrasi glomerulus, sekresi tubular aktif dan reabsorpsi tubular. Filtrasi glomerulus merupakan suatu proses tidak langsung yang terjadi untuk sebagian besar molekul-molekul kecil ($BM < 500$), meliputi obat-obat yang tidak terdisosiasi/tidak terionisasi dan terdisosiasi/terionisasi. Obat-obat yang terikat protein merupakan molekul-molekul besar dan tidak dapat difiltrasi pada glomerulus. Laju filtrasi glomerulus normal sebesar 125-130 ml/menit. Filtrasi glomerulus berhubungan langsung dengan konsentrasi obat bebas atau yang terikat bukan dengan protein dalam plasma. Bila konsentrasi obat bebas dalam plasma naik, filtrasi glomerulus obat akan naik secara proporsional.

Sekresi aktif melalui ginjal merupakan proses transport aktif yang diperantarai pembawa yang membutuhkan masukan energi, karena obat diangkut melawan suatu gradien konsentrasi. Sistem pembawa kapasitasnya terbatas dan dapat dijenuhkan. Dengan demikian, obat dengan struktur yang sama dapat bersaing untuk sistem pembawa yang sama. Sistem sekresi aktif melalui ginjal memiliki dua sistem, yaitu sistem untuk asam lemah dan basa lemah. Ikatan protein mempunyai efek yang sangat kecil terhadap waktu paruh eliminasi obat yang terutama diekskresi dengan sekresi aktif. Reabsorpsi tubular terjadi setelah obat difiltrasi melalui glomerulus dan dapat aktif atau pasif. Jika suatu obat direabsorpsi secara sempurna, maka harga klirens obat mendekati nol. Obat-obat yang direabsorpsi sebagian, harga klirensnya menjadi lebih kecil dari laju filtrasi glomerulus normal.

Reabsorpsi obat-obat yang bersifat asam atau basa lemah dipengaruhi oleh dua faktor yang secara bersamaan menjadi determinan persentase obat terdisosiasi/terionisasi atau tidak, yaitu pH cairan dalam tubulus ginjal (pH urin) dan pKa obat. Umumnya jenis obat yang tak terdisosiasi, lebih larut dalam lemak

(sedikit larut dalam air) dan mempunyai permeabilitas membran lebih besar. Obat-obat tersebut dengan mudah direabsorpsi dari tubulus ginjal kembali ke dalam tubuh. Proses reabsorpsi obat ini secara bermakna dapat mengurangi jumlah obat yang diekskresi. Nilai pKa obat tetap, tapi pH urin normal dapat berubah dari 4,5 sampai 8,0, bergantung pada diet, patofisiologi, dan masukan obat. Diet sayur-sayuran atau diet kaya karbohidrat akan mengakibatkan pH urin lebih tinggi, sedangkan diet kaya protein akan mengakibatkan pH urin yang rendah. Obat-obat seperti asam askorbat dan antasid dapat mengubah pH urin bila diberikan dalam jumlah besar. Keadaan patofisiologis seperti asidosis atau alkalosis ataupun keadaan toksik seperti keracunan aspirin, juga dapat mengakibatkan perubahan pH urin.

Persentase obat yang bersifat asam lemah dapat terionisasi sehubungan dengan pengaturan pH dapat diperoleh dari persamaan *Henderson-Hasselbalch*:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{terionisasi}]}{[\text{tidak terionisasi}]} \quad (2.1)$$

rumus tersebut disusun kembali menjadi:

$$10^{\text{pH}-\text{pKa}} = \frac{[\text{terionisasi}]}{[\text{tidak terionisasi}]} \quad (2.2)$$

$$\begin{aligned} \text{Prosen obat terionisasi} &= \frac{[\text{terionisasi}]}{[\text{terionisasi}] + [\text{tidak terionisasi}]} \\ &= \frac{10^{\text{pH}-\text{pKa}} [\text{tak terionisasi}]}{10^{\text{pH}-\text{pKa}} [\text{tak terionisasi}] + [\text{tidak terionisasi}]} \end{aligned}$$

$$\text{Prosen obat terionisasi} = \frac{10^{\text{pH}-\text{pKa}}}{10^{\text{pH}-\text{pKa}} + 1} \quad (2.3)$$

Perubahan pH urin akan mempengaruhi tingkat disosiasi. Dalam hal ini, tingkat disosiasi lebih dipengaruhi oleh perubahan pH urin untuk suatu obat dengan pKa 5 daripada pKa 3. Asam-asam lemah dengan pKa lebih kecil dari 2 banyak terionisasi pada seluruh kondisi pH urin dan hanya sedikit dipengaruhi oleh perubahan pH urin. Untuk obat yang bersifat basa lemah, persamaan *Henderson-Hasselbalch* menjadi:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{terionisasi}]}{[\text{tidak terionisasi}]} \quad (2.4)$$

$$\text{dan Prosen obat terionisasi} = \frac{10^{\text{pH}-\text{pKa}} + 1}{10^{\text{pH}-\text{pKa}}} \quad (2.5)$$

Efek terbesar dari pH urin pada reabsorpsi terjadi pada obat-obat yang bersifat basa lemah dengan pKa 7,5-10,5. Dari persamaan *Henderson-Hasselbalch*, perbandingan konsentrasi distribusi asam atau basa lemah antara urin dan plasma dapat diperoleh. Perbandingan urin-plasma (U:P) untuk obat ini adalah:

$$\frac{U}{P} = \frac{10^{\text{pH urin} - \text{pKa}} + 1}{10^{\text{pH plasma} - \text{pKa}} + 1} \quad (2.6)$$

$$\text{untuk basa lemah: } \frac{U}{P} = \frac{10^{\text{pKa} - \text{pH urin}} + 1}{10^{\text{pKa} - \text{pH plasma}} + 1} \quad (2.7)$$

Tabel 2.2 Pengaruh pH urin dan pKa pada ionisasi obat

pH urin	Prosen obat terionisasi: pKa 3	Prosen obat terionisasi: pKa 5
7,4	100	99,6
5	99	50,0
4	91	9,1
3	50	0,99

[Sumber: Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan. (Ed. ke-2), 1985]

2.2.2 Analisis obat dalam urin (Wirth dan Jarett, 1980; Shargel dan Yu, 1985; Somogyi, 2005)

Data ekskresi obat lewat urin dapat dipakai untuk memperkirakan bioavailabilitas. Agar dapat diperkirakan dengan valid, obat harus diekskresi dengan jumlah yang bermakna di dalam urin dan cuplikan urin harus dikumpulkan secara lengkap. Jumlah kumulatif obat yang diekskresi dalam urin secara langsung berhubungan dengan jumlah total obat yang terabsorpsi. Dalam percobaan, cuplikan urin dikumpulkan secara berkala setelah pemberian produk obat. Tiap cuplikan ditetapkan kadar obat bebas dengan cara yang spesifik. Kemudian dibuat grafik yang menghubungkan kumulatif obat yang diekskresi terhadap jarak waktu pengumpulan.

Tetapan laju eliminasi, K_e , dapat dihitung dari data ekskresi urin. Dalam penghitungan ini, laju ekskresi obat dianggap sebagai orde kesatu. K_e adalah tetapan laju ekskresi ginjal, D_u adalah jumlah obat yang diekskresi dalam urin, dan D_B adalah jumlah obat di dalam tubuh.

$$\frac{dD_u}{dt} = K_e D_B \quad (2.8)$$

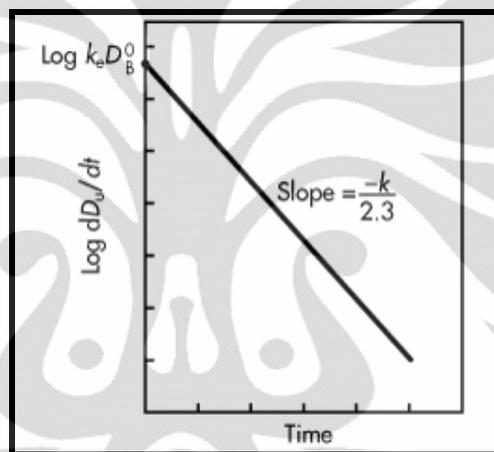
Dari Persamaan 2.8, D_B disubstitusi dengan $D_B^0 e^{-kt}$

$$\frac{dD_u}{dt} = K_e D_B^0 e^{-kt} \quad (2.9)$$

Dengan memakai logaritma natural untuk kedua sisi dari persamaan tersebut dan kemudian diubah ke logaritma biasa, diperoleh:

$$\log \frac{dD_u}{dt} = \frac{-kt}{2.3} + \log K_e D_B^0 \quad (2.10)$$

dengan menggambarkan $\log dD_u/dt$ terhadap waktu (Gambar 2.4) diperoleh suatu garis lurus, slop = $-K/2,3$ dan intersep $y = \log K_e D_B^0$.



[Sumber: Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan. (Ed. ke-2), 1985]

Gambar 2.4 Grafik semilogaritmik Persamaan 2.10

Oleh karena eliminasi suatu obat biasanya dipengaruhi oleh ekskresi ginjal atau metabolisme (biotransformasi), maka dapat digunakan persamaan:

$$K = K_m + K_e \quad (2.11)$$

K_m adalah laju proses metabolisme orde kesatu dan K_e adalah laju proses ekskresi orde kesatu. Maka waktu paruh dihitung mengikuti kinetika orde satu, yakni:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K} \quad (2.12)$$

Laju ekskresi obat lewat urin (dD_u/dt) tidak dapat ditentukan melalui percobaan segera setelah pemberian obat. Dalam praktek, urin dikumpulkan pada jarak waktu tertentu dan konsentrasi obat dianalisis. Kemudian laju ekskresi urin rata-rata dihitung untuk tiap waktu pengumpulan. Harga dD_u/dt rata-rata digambar

pada suatu skala semilogaritmik terhadap waktu yang merupakan harga tengah (titik tengah) waktu pengumpulan.

Selama waktu pengumpulan urin, banyak faktor yang berpotensi mengganggu kestabilan urin yang akan dianalisis, beberapa di antaranya adalah proliferasi bakteri, pH urin yang semakin basa, oksidasi pigmen empedu, dan evaporasi keton. Pencegahan ketidakstabilan urin dapat dilakukan dengan penyimpanan urin pada suhu 4⁰C atau penggunaan pengawet urin (toluen, kloroform, atau formalin). Penggunaan pengawet urin tidak sepenuhnya memuaskan dalam menjaga kestabilan urin, dan analisis urin yang benar-benar valid dilakukan sampai 2 jam setelah pengumpulan.

Faktor-faktor tertentu dapat mempersulit untuk mendapatkan data ekskresi urin yang sah. Beberapa faktor tersebut adalah:

- a. Suatu fraksi yang mengandung obat yang tidak berubah (utuh) harus diekskresi dalam urin;
- b. Teknik penetapan kadar harus spesifik untuk obat yang tidak berubah (utuh), dan harus tidak dipengaruhi oleh metabolit-metabolit obat yang mempunyai struktur kimia serupa;
- c. Diperlukan pengambilan cuplikan yang sering untuk mendapatkan gambaran kurva yang baik;
- d. Cuplikan data urin hendaknya dikumpulkan secara berkala sampai hampir semua obat diekskresi. Suatu grafik dari kumulatif obat yang diekskresi vs waktu akan menghasilkan kurva yang mendekati asimtot pada “waktu tak terhingga”. Dalam praktek, diperlukan kurang lebih 7 X t^{1/2} eliminasi untuk mengeliminasi 99% obat.
- e. Perbedaan pH urin dan volume dapat menyebabkan perbedaan laju ekskresi urin yang bermakna.

2.3 Agen Alkalinisasi dan Asidisasi pH Urin

Pengaruh pH urin terhadap waktu paruh obat dapat dianalisis pada pH urin yang bervariasi, yaitu pada pH urin normal dan pH urin yang lebih basa atau lebih asam dari pH urin normal. Penggunaan agen alkalinisasi dan asidisasi pH urin

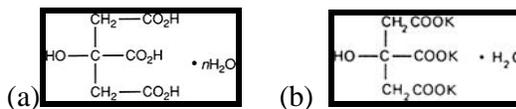
bertujuan untuk memperoleh kondisi pH urin yang diperlukan selama analisis berlangsung. Beberapa agen alkalinisasi dan asidisasi urin adalah sebagai berikut:

2.3.1 Agen alkalinisasi pH urin

2.3.1.1 Natrium bikarbonat (Farmakope Indonesia Ed. ke-4, 1995; Lacy, Armstrong, Goldman, dan Lance, Drug Information Handbook, 2005; OECD SIDS, 2002b)

Natrium bikarbonat, NaHCO_3 , dengan berat molekul 84,01 g/mol, memiliki sinonim yaitu natrium subkarbonat, natrium asam karbonat, natrium hidrogen karbonat. NaHCO_3 berbentuk serbuk hablur warna putih, stabil di udara kering, tetapi dalam udara lembab secara perlahan-lahan terurai. NaHCO_3 larut dalam air; tidak larut dalam etanol. Mekanisme kerja NaHCO_3 yaitu menyediakan ion bikarbonat yang menetralkan konsentrasi ion hidrogen dan meningkatkan pH darah dan urin. NaHCO_3 digunakan pada penanganan asidosis metabolik, hiperasiditas gastrik, sebagai agen alkalinisasi untuk urin, terapi hiperkalemia, penanganan over dosis pada beberapa obat termasuk antidepresan trisiklik dan aspirin. Obat ini dikontraindikasikan pada alkalosis, hipernatremia, edema paru, hipokalsemia, nyeri abdomen yang tidak diketahui. Obat ini diabsorpsi secara baik pada pemberian secara oral. Ekskresi melalui urin kurang dari 1%. Untuk alkalinisasi pH urin, dosis inisiasinya sebanyak 4 g, kemudian sebanyak 1-2 g setiap 4-6 jam. Onsetnya pada pemberian melalui oral sangat cepat, durasi kerja 8-10 menit, diabsorpsi dengan baik, dan diekskresi melalui urin. Larutan natrium bikarbonat stabil dengan penyimpanan dalam wadah tertutup baik pada suhu ruangan, terlindung dari panas dan pembekuan, dan hanya digunakan bila larutan jernih. LD_{50} natrium bikarbonat pada tikus sebesar 4000 mg/kg berat badan pada pemberian secara oral.

2.3.1.2 Kalium sitrat dan asam sitrat



[Sumber: WHO pharmacopoeia library, 2008]

Gambar 2.5 Struktur kimia (a) asam sitrat dan (b) kalium sitrat

Kombinasi dari kalium sitrat ($C_6H_5K_3O_7 \cdot H_2O$, berat molekul: 324,4 g/mol) dan asam sitrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, berat molekul: 192,1 g/mol) diindikasikan sebagai agen alkalinisasi pH urin saat dibutuhkan urin dengan pH basa dalam waktu yang lama, misalnya pada asidosis metabolik. Dosis yang diberikan untuk orang dewasa sebesar 3300 mg kalium sitrat dan 1002 mg asam sitrat yang dilarutkan dalam air minum setelah makan dan waktu tidur (Lacy, Armstrong, Goldman, dan Lance, 2005; WHO, 2008).

2.3.2 Agen asidisasi pH urin

2.3.2.1 Amonium klorida

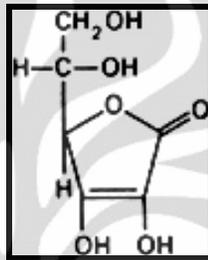
Amonium klorida, NH_4Cl (berat molekul: 53,49 g/mol), mudah larut dalam air dan gliserin, lebih mudah larut dalam air mendidih, dan sedikit larut dalam etanol (Farmakope Indonesia Ed. ke-4, 1995). Indikasinya sebagai terapi alkalosis metabolik, meningkatkan konsentrasi ion hidrogen, dengan dosis sebesar 0,1 g/kg berat badan sehari sekali untuk pemberian secara oral pada orang dewasa (Jin Suk Han, Gheun-ho Kim, Earm, dan Joo, 1998). Absorpsinya terjadi secara cepat melalui saluran pencernaan, dimetabolisme di hati menjadi urea dan HCl, dan diekskresi dalam urin. Peningkatan konsumsi air diperlukan selama terapi menggunakan amonium klorida. LD_{50} pada tikus sebesar 1650 mg/kg berat badan pada pemberian secara oral (Chem One Corporation, 1999). Larutannya stabil dengan penyimpanan dalam wadah tertutup rapat pada suhu 15^0-30^0C . Larutan bisa mengalami kristalisasi jika terpapar pada suhu rendah. Jika teramati adanya kristal, larutan dalam vial dihangatkan pada penangas air sebelum dipakai (Lacy, Armstrong, Goldman, dan Lance, 2005).

2.3.2.2 Kalium dihidrogen fosfat

Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4 , berat molekul: 136,09 g/mol) diindikasikan sebagai agen asidisasi pH urin. Mekanisme kerjanya adalah meningkatkan kation intraseluler termasuk pada transmisi terhadap impuls saraf, kontraksi otot, dan aktivitas enzim. Obat ini diabsorpsi dengan baik melalui saluran pencernaan dan didistribusi ke dalam sel melalui transport aktif dari cairan ekstraseluler. Ekskresi utamanya melalui urin, sebagian kecil melalui kulit dan

feses. Dosisnya untuk pemberian secara oral sebesar 1 g yang dilarutkan dalam 6-8 ml air empat kali sehari pada orang dewasa. Pemberian sediaan ini harus disertai dengan makanan karena efek sampingnya yang tidak diinginkan pada saluran cerna, yaitu diare, mual, sakit perut, kembung, dan muntah (Lacy, Armstrong, Goldman, dan Lance, 2005).

2.3.2.3 Asam askorbat



[Sumber: WHO pharmacopoeia library, 2008]

Gambar 2.6 Struktur kimia asam askorbat

Asam askorbat yang biasa diindikasikan untuk pencegahan dan pengobatan skorbut dapat diberikan sebagai agen asidifikasi pH urin dengan dosis pemberian secara oral sebesar 4-12 g/hari dalam 3-4 kali pemberian untuk orang dewasa, dan sebesar 500 mg setiap 6-8 jam untuk anak-anak. Asam askorbat termasuk salah satu vitamin yang mudah larut dalam air. Kestabilan larutannya dijaga dengan penyimpanan yang terlindung dari cahaya (Lacy, Armstrong, Goldman, dan Lance, 2005). Efek samping dari penggunaannya adalah diare karena terjadi iritasi pada mukosa usus yang mengakibatkan peningkatan peristaltik (Dewoto, 2007). LD₅₀ pada tikus sebesar 11.900 mg/kg berat badan pada pemberian secara oral (Material Safety Data Sheet: Ascorbic Acid, 2005).

2.4 Validasi Metode Analisis (FDA, 2001; Harmita, 2006; Harmita, Analisis Kuantitatif dan Bahan Baku Sediaan Farmasi, 2006)

Validasi metode analisis adalah proses dimana suatu metode ditetapkan melalui serangkaian uji laboratorium bahwa karakter penampilan metode tersebut memenuhi persyaratan untuk penerapan metode yang dimaksud. Tujuan utama validasi metode analisis adalah untuk menjamin bahwa metode analisis yang

digunakan mampu memberikan hasil yang cermat dan handal hingga dapat dipercaya. Beberapa parameter penampilan analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis, yaitu:

2.4.1 Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat dekatnya hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Cara yang umum digunakan untuk menentukan kecermatan adalah berdasarkan persentase yang didapat dari kurva linear standar. Kecermatan diperiksa dengan menghitung perbedaan nilai yang terukur dengan nilai yang sebenarnya (*% diff*). Nilai rata-rata yang diperoleh tidak boleh menyimpang lebih dari +15% dan -15%.

2.4.2 Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Kriteria seksama untuk sampel dari matriks biologis diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 15% atau kurang. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis. Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen.

2.4.3 Uji perolehan kembali (*recovery*)

Perolehan kembali suatu analit adalah perbandingan antara respon detektor yang diperoleh dari sejumlah analit yang ditambahkan dan diekstraksi dari matriks biologis dengan respon detektor yang diperoleh untuk kadar sebenarnya dari standar murni. Persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil kadar yang diperoleh dengan kadar yang sebenarnya. Kriteria cermat diberikan jika hasil analisis memberikan rasio antara 80%-120%.

2.4.4 Selektivitas (spesifisitas)

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama walaupun ada komponen lain yang mungkin terdapat dalam matriks sampel. Dalam spektrofotometri, selektivitas analit dapat ditingkatkan dengan reaksi kimia dari analit menggunakan reagen yang selektif.

2.4.5 Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linearitas yang dapat diterima.

Sebagai parameter adanya hubungan linear digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linear $y = a + bx$. Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Untuk metode analisis dalam matriks biologis seperti urin, linearitas dipenuhi dengan menghasilkan harga koefisien korelasi (r) sebesar 0,98. Parameter lain yang harus dihitung yaitu simpangan baku residual (S_y), sehingga akan diperoleh standar deviasi fungsi regresi (S_{X_0}) dan koefisien variasi fungsi regresi (V_{X_0}). Syarat-syarat dari kelinearan garis adalah sebagai berikut:

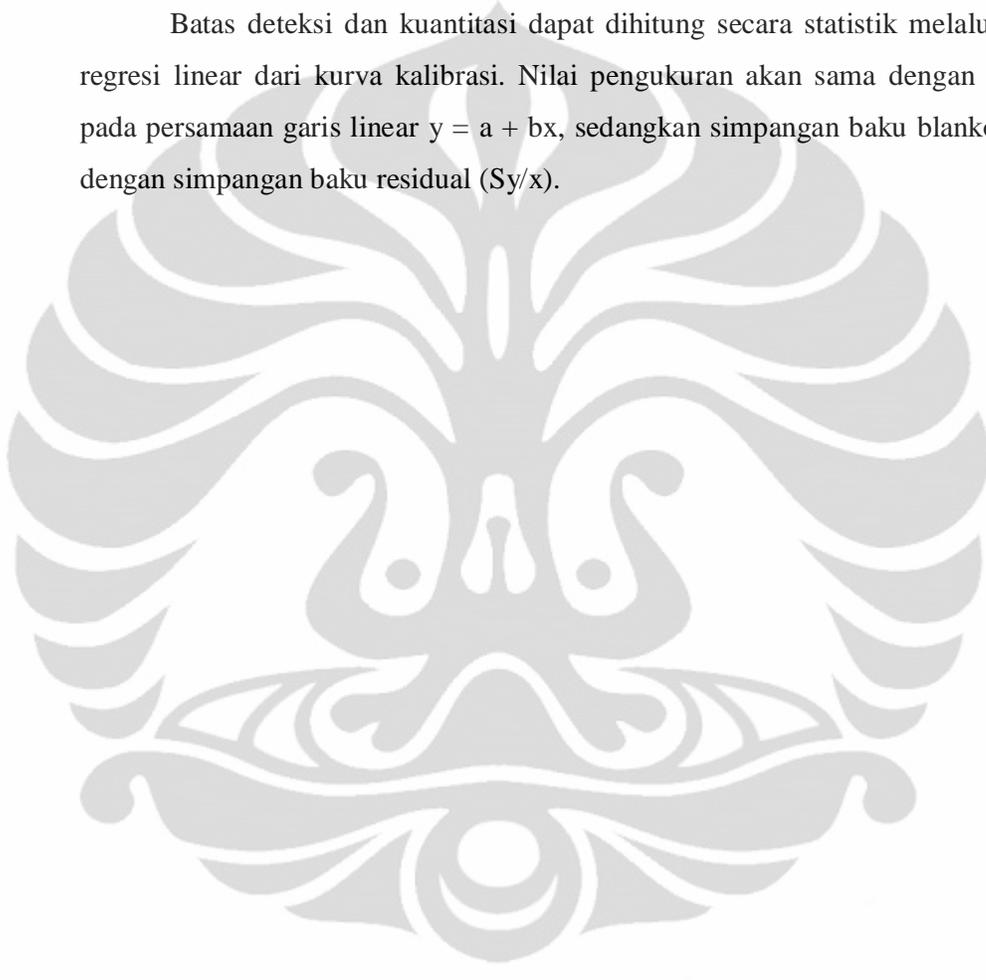
- Koefisien korelasi (r) $\geq 0,9990$
- Jumlah kuadrat sisa masing-masing titik temu (r_i) mendekati nol (0), (r_i)² sekecil mungkin ≈ 0 . r_i diperoleh dari: $r_i = y_i - (b x_i + a)$
- Koefisien fungsi regresi (V_{X_0}) $\leq 2,0\%$ untuk sediaan farmasi dan $\leq 5,0\%$ untuk sediaan biologi.
- Kepekaan analisis ($\Delta y/\Delta x$)

$$\Delta y/\Delta x = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \approx \frac{y_3 - y_2}{x_3 - x_2} \approx \frac{y_n - y_{n-1}}{x_n - x_{n-1}}$$

2.4.6 Batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ)

Batas deteksi (LOD) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas kuantitasi (LOQ) merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ($S_{y/x}$).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi-Farmakokinetika dan Laboratorium Kimia Kuantitatif Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia. Penelitian dilakukan dari bulan Februari sampai bulan Mei 2011.

3.2 Bahan

3.2.1 Hewan uji

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague-Dawley* berumur kurang lebih 3-4 bulan dengan berat badan 150-260 gram sebanyak 25 ekor (Gambar 3.1). Tikus ini diperoleh dari Fakultas Peternakan Bagian Non Ruminansia dan Satwa Harapan Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor.

3.2.2 Spesimen urin

Pada penelitian ini, spesimen urin diperoleh dari hewan uji yang diberikan agen alkalinisasi/asidisasi pH urin dan diberikan bahan uji.

3.2.3 Bahan uji

Pada penelitian ini, bahan uji yang digunakan adalah asetosal yang dibuat dalam bentuk suspensi oral.

3.2.4 Bahan kimia

Pada penelitian ini, bahan-bahan kimia yang digunakan adalah asetosal (Yixing City Xingyu), natrium bikarbonat (RRC), CMC (Brataco), besi (III) amonium sulfat (Merck), asam sulfat (Merck), aquadest, toluene (Merck).

3.3 Alat

Pada penelitian ini, alat yang digunakan adalah sonde lambung, alat-alat gelas, lumpang alu, timbangan analitik (Ohaus), spuit (Terumo),

spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1601), pH meter (Eutech Instrument pH 510), *sentrifugator* (Kubota 5100), *stopwatch*, lemari pendingin, kandang metabolisme.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Persiapan hewan uji

Tikus diaklimatisasi selama 2 minggu di kandang hewan FMIPA UI. Aklimatisasi bertujuan agar tikus beradaptasi dengan lingkungan baru dan meminimalisasi efek stres pada tikus yang dapat berpengaruh pada metabolismenya dan dapat mengganggu penelitian. Setiap tikus diberi makan dan minum serta ditimbang berat badannya secara rutin. Tikus yang digunakan dalam penelitian harus sehat dengan tanda-tanda bulu tidak berdiri, warna putih bersih, mata jernih, tingkah laku normal. Tikus yang diikuti dalam percobaan harus sehat dan berat badannya harus sesuai.

3.4.2 Penetapan dosis

3.4.2.1 Asetosal

Penetapan dosis dilakukan dengan mengkonversi dosis manusia ke dosis tikus berdasarkan konversi Paget dan Barnes (Paget dan Barnes, 1964), yaitu dengan mengalikannya dengan 0,018 dan faktor farmakokinetika yaitu 10.

Dosis asetosal yang digunakan pada manusia yaitu 1,2-4 gram sehari. Dipilih dosis 1,2 g dan dikonversi ke tikus 200g dengan mengalikan dengan faktor farmakokinetik

$$= 1,2 \text{ g} \times 0,018 \times 10$$

$$= 0,216 \text{ g / tikus 200 g}$$

3.4.2.2 Natrium bikarbonat

Dosis untuk agen alkalinisasi urin yang digunakan pada manusia adalah 1-2 g NaHCO₃ tiap 6 jam. Dosis NaHCO₃ untuk 200 g tikus setelah dikonversi berdasarkan konversi Paget dan Barnes (Paget dan Barnes, 1964)

$$= 1-2 \text{ g tiap 6 jam} \times 0,018 \times 10$$

$$= 0,18-0,36 \text{ g tiap 6 jam/tikus 200 g}$$

Pada penelitian ini, pH urin tikus dibuat basa dengan memberikan natrium bikarbonat dalam 3 variasi dosis, yaitu dosis 0,18 g; 0,27 g; dan 0,36 g per tikus 200 g tiap 6 jam.

3.4.2.3 Amonium klorida

Dosis amonium klorida untuk terapi alkalosis metabolik dengan mekanisme pengasaman darah dan urin sebesar 0,1 g/kg berat badan sehari sekali untuk pemberian secara oral. Dosis pada tikus sebesar 0,1 mg/g berat badan tikus per hari.

3.4.2.4 Asam askorbat

Dosis asam askorbat dengan tujuan asidisasi pH urin yang digunakan adalah 6 g/hari pada manusia (dewasa). Dosis pada tikus setelah dikonversi, berdasarkan konversi Paget dan Barnes, sebesar 1080 mg/hari dalam 3-4 kali pemberian.

3.4.3 Penyiapan bahan uji, agen alkalinisasi urin dan larutan pereaksi

3.4.3.1 Pembuatan suspensi oral asetosal

Suspensi oral asetosal dibuat dengan formulasi sebagai berikut:

R/	Asetosal	1 g
	Gliserol	15%
	CMC Na	0,5%
	m. f. Susp	10 ml

Asetosal dibuat dalam bentuk suspensi oral 100 mg/ml dengan menggunakan larutan CMC 0,5% sebagai *suspending agent*. Dosis asetosal untuk 1 tikus berdasarkan perhitungan dosis sebanyak 216 mg. Tikus yang diberi suspensi asetosal yaitu tikus pada kelompok II, III, IV, dan V. Jadi total tikus yang diberi asetosal ada 4 tikus setiap *batch* (perwakilan dari setiap kelompok perlakuan).

1 tikus = 216 mg asetosal → 2,16 mL suspensi asetosal

4 tikus = 864 mg asetosal → 8,64 mL suspensi asetosal

Pada pembuatannya dlebihkan menjadi 10 mL suspensi asetosal dalam larutan CMC 0,5%. Maka asetosal yang ditimbang sebanyak 1.000 mg.

Pertama-tama dibuat terlebih dahulu larutan CMC 0,5%. CMC ditimbang sebanyak: $\frac{0,5g}{100ml} \times 10ml = 0,05g$. Kemudian dikembangkan di dalam lumpang selama 30 menit dalam air panas suhu 80°C sebanyak 20 kali bobot CMC = $20 \times 0,05g = 1,0ml$. Setelah mengembang, CMC digerus hingga homogen dan larut.

Asetosal sebanyak 1.000 mg digerus di dalam lumpang lain bersama gliserol 15%: $\frac{15}{100} \times 10ml = 1,5ml$ hingga homogen. Lalu campuran homogen asetosal dalam gliserol dicampurkan sedikit demi sedikit ke dalam CMC. Campuran tersebut digerus hingga terbentuk suspensi homogen. Air ditambahkan sedikit demi ke dalam lumpang hingga volume suspensi menjadi 10 mL.

Gliserol digunakan dalam suspensi ini sebagai *wetting agent* yang dapat meningkatkan kelarutan asetosal, sehingga suspensi yang terbentuk lebih baik dan homogen. Banyaknya gliserol yang digunakan juga masih di bawah LD₅₀ pada tikus yaitu sebesar 25-27,5 g/kg berat badan tikus (OECD SIDS, 2002a).

3.4.3.2 Pembuatan larutan natrium bikarbonat 10%

Sejumlah 10,0 g NaHCO₃ ditimbang seksama, kemudian dimasukkan ke dalam lumpang, dilarutkan dengan aquadest dengan cara gerus tuang, yaitu digerus terlebih dahulu dengan aquadest 20 mL, bagian yang larut dimasukkan ke labu. Lalu digerus lagi bagian yang belum larut dengan 20 mL aquadest, bagian yang larut dimasukkan ke labu ukur, begitu seterusnya hingga semua larut dan dicukupkan volumenya hingga 100,0 mL, sehingga didapat larutan NaHCO₃ 10%.

3.4.3.3 Pembuatan Larutan amonium klorida 1%

Sejumlah 250 mg amonium klorida (NH₄Cl) ditimbang seksama kemudian dilarutkan dalam aquadest di labu ukur 25,0 mL, dan dicukupkan volumenya hingga batas labu ukur, sehingga didapat larutan amonium klorida 1%.

3.4.3.4 Pembuatan Larutan asam askorbat 10%

Sejumlah 5 g asam askorbat ditimbang seksama kemudian dilarutkan dalam aquadest di labu ukur 50,0 mL, dan dicukupkan volumenya hingga batas labu ukur, sehingga didapat larutan asam askorbat 10%.

3.4.3.5 Pembuatan larutan besi (III) amonium sulfat 0,17%

Sejumlah 0,17 g besi (III) amonium sulfat ditimbang seksama, lalu dilarutkan dalam asam sulfat 0,1 N di labu ukur 100,0 mL, dan dicukupkan volumenya hingga batas labu ukur, sehingga didapat larutan besi (III) amonium sulfat 0,17%.

3.4.4 Uji pendahuluan

Analisis *in vivo* memiliki beberapa faktor kendala dalam pelaksanaannya. Beberapa faktor kendala utamanya adalah variasi biologis dalam pemilihan hewan uji, dosis obat dan rute pemberiannya, serta waktu yang sesuai untuk pengambilan cuplikan dari cairan biologis guna memperoleh data yang relevan dengan analisis eliminasi obat (Trevor, Rowland, dan Way, 1972). Variasi biologis dari hewan uji terhadap kondisi percobaan dan kontrol urinasi pada tiap cuplikan harus diorientasi terlebih dahulu. Hal ini bertujuan meminimalisasi pengaruh dari faktor kendala pada analisis obat dalam urin.

3.4.4.1 Uji urinasi pada tikus

Uji urinasi pada tikus dilakukan untuk mengetahui waktu urinasi dan volume urin yang dihasilkan agar dapat ditentukan waktu-waktu pengambilan cuplikan urin untuk dianalisis. Uji ini dilakukan dengan memberi minum air hangat (30° - 40° C) sebanyak 5 ml setiap jam; setiap 1,5 jam; dan setiap 2 jam selama 10 jam. Waktu urinasi pada tikus dan volume urin yang dihasilkan tiap kali urinasi dicatat. Uji ini dilakukan pada 3 ekor tikus untuk setiap uji pendahuluan dan tikus dipuasakan selama pengujian.

3.4.4.2 Uji alkalinisasi dan asidisasi pH urin pada tikus

Pada uji ini dilakukan pengaturan pH urin menggunakan natrium bikarbonat sebagai agen alkalinisasi, sedangkan agen asidisasinya adalah amonium klorida dan asam askorbat. Uji ini perlu dilakukan terlebih dahulu guna mengetahui pH urin yang dicapai dan kestabilannya. Uji ini dilakukan pada 3 ekor tikus untuk setiap kondisi pH urin yang hendak dicapai (asam dan basa). Urin yang dihasilkan oleh tikus sebelum diberi agen alkalinisasi maupun asidisasi pH urin diukur terlebih dahulu dengan pH meter sebagai pH normal. Kemudian agen alkalinisasi ataupun asidisasi diberikan dan disertai dengan pemberian air hangat (30° - 40° C) sebanyak 5 ml/100 gram berat badan. Setelah itu, pemberian air hangat dilakukan secara rutin sebanyak 5 ml/jam selama 11 jam. Pengukuran pH urin dilakukan setiap jam dan dicatat.

Pada uji alkalinisasi, pH urin tikus dibuat basa dengan natrium bikarbonat dalam variasi dosis, yaitu 0,18 g; 0,27 g; dan 0,36 g per tikus yang diberikan setiap 4 jam dan setiap 6 jam. Sedangkan uji asidisasi pH urin dilakukan dengan pemberian amonium klorida 0,1 mg/g berat badan tikus yang diberikan setiap 6 jam. Selain itu, agen asidisasi pH urin lain yang juga diorientasi adalah asam askorbat dengan dosis 1080 mg/hari dalam 3-4 kali pemberian atau setiap 4 jam.

3.4.4.3 Uji metode analisis dan stabilitas asam salisilat dalam urin secara in vitro

Asam salisilat ditimbang seksama sebanyak 50,0 mg dan dilarutkan dalam aquadest hingga volumenya 25,0 mL, sehingga didapat larutan asam salisilat dalam aquadest dengan konsentrasi sebesar 2000 μ g/ml. Larutan tersebut dipipet 1,0; 3,0; 5,0 mL dengan menggunakan pipet volume dan dimasukkan masing-masing ke dalam labu ukur 10,0 mL dan dicukupkan volumenya dengan urin blanko, sehingga didapatkan larutan asam salisilat dalam urin dengan konsentrasi 200; 600; 800 μ g/ml.

Ketiga larutan di atas masing-masing dipipet 1,0 ml dan dimasukkan masing-masing ke dalam tabung sentrifus, lalu disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Setelah itu, bagian jernih yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan direaksikan dengan 2 ml larutan besi (III) amonium sulfat 0,17%. Reaksi tersebut akan menghasilkan kompleks besi salisilat yang

berwarna ungu. Setelah didiamkan 20 menit, larutan hasil reaksi tadi diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur blanko pada panjang gelombang maksimum, yaitu 530 nm (Siddiqui, Bhatti, Ijaz, Rasheed, dan Saleem, 2003).

Selanjutnya, larutan asam salisilat dalam urin dengan konsentrasi 200; 600; 800 $\mu\text{g/ml}$ diuji stabilitasnya dengan diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 530 nm dengan prosedur pengukuran seperti yang telah disebutkan. Pengukuran serapan dilakukan masing-masing pada jam ke-0; 2; dan 5 setelah penyimpanan pada suhu ruang; suhu *refrigerator*; dan suhu *freezer*, kemudian dilihat kestabilan serapannya.

3.4.5 Pelaksanaan percobaan

Untuk mengetahui adanya pengaruh pH urin yang dibuat basa dengan pemberian larutan natrium bikarbonat dalam 3 variasi dosis terhadap jumlah kumulatif asam salisilat yang diekskresikan digunakan metode analisis obat dalam urin. Uji ini menggunakan satu kelompok kontrol normal, satu kelompok kontrol asetosal, dan tiga kelompok variasi pH urin basa. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus putih jantan. Penentuan jumlah tikus pada setiap kelompok dihitung berdasarkan rumus Federer : $(n - 1)(t - 1) \geq 15$, dimana n menunjukkan jumlah ulangan minimal dari tiap perlakuan dan t menunjukkan jumlah perlakuan. Penentuan jumlah hewan uji dan pembagian kelompok adalah sebagai berikut :

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

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

$$(n - 1)(4) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \approx 5$$

Tabel 3.1 Pembagian kelompok hewan uji

Kelompok	Perlakuan
(I) Kontrol normal	Diberi larutan CMC 0,5% yang mengandung gliserol sebanyak 15%; kemudian diberi minum air hangat 5 ml/100 g berat badan, pada setiap jam selanjutnya diberi air hangat 5 ml.
(II) Kontrol asetosal	Diberikan peroral suspensi asetosal dosis 216 mg/200 g berat badan; kemudian diberi minum air hangat 5 ml/100 g berat badan, pada setiap jam selanjutnya diberi air hangat 5 ml.
(III) Asetosal pada pH urin basa I	Diberikan peroral larutan NaHCO ₃ 10% dosis I (180 mg/200 g berat badan) setiap 6 jam; 1 jam kemudian diberikan peroral suspensi asetosal dosis 216 mg/200 g berat badan; kemudian diberi minum air hangat 5 ml/100 g berat badan, pada setiap jam selanjutnya diberi air hangat 5 ml.
(IV) Asetosal pada pH urin basa II	Diberikan peroral larutan NaHCO ₃ 10% dosis II (270 mg/200 g berat badan); 1 jam kemudian diberikan peroral suspensi asetosal dosis 216 mg/200 g berat badan; kemudian diberi minum air hangat 5 ml/100 g berat badan, pada setiap jam selanjutnya diberi air hangat 5 ml.
(V) Asetosal pada pH urin basa III	Diberikan peroral larutan NaHCO ₃ 10% dosis III (360 mg/200 g berat badan); 1 jam kemudian diberikan peroral suspensi asetosal dosis 216 mg/200 g berat badan; kemudian diberi minum air hangat 5 ml/100 g berat badan, pada setiap jam selanjutnya diberi air hangat 5 ml.

Masing-masing tikus dari setiap kelompok mendapat perlakuan sebagai berikut:

- a. Tikus dipuasakan selama 10 jam dengan hanya diberi air minum yang disediakan di dalam kandang.
- b. Sebelum obat diberikan, urin tikus ditampung dan diambil secukupnya sebagai urin blanko.
- c. Setelah dipuasakan selama 10 jam, larutan NaHCO_3 dosis I diberikan pada tikus kelompok III; dosis II pada tikus kelompok IV; dosis III pada tikus kelompok V. Satu jam kemudian, larutan CMC 0,5% yang mengandung gliserol sebanyak 15% diberikan pada tikus kelompok I dan suspensi asetosal diberikan pada tikus kelompok II, III, IV, dan V.
- d. Larutan NaHCO_3 diberikan setiap 6 jam dan air hangat diberikan setiap 1 jam.
- e. Setiap interval waktu pengambilan cuplikan, volume urin yang diekskresikan dicatat. Waktu pengambilan cuplikan adalah pada jam ke-1, 2, 3, 4, 5, 10. Waktu interval dimulai sejak obat diberikan.
- f. Urin ditampung dalam wadah yang telah diisi dengan pengawet urin (toluen 1-2 tetes). Setelah pengambilan cuplikan, urin segera dianalisis. Prosedur analisis urin dapat dilihat pada prosedur penanganan spesimen urin.
- g. Cuplikan urin dijaga agar tidak ada cuplikan urin yang hilang.
- h. Pengumpulan urin dikerjakan sampai hampir seluruh obat dalam bentuk utuh telah diekskresikan, sekitar $\pm 87,5\%$ di dalam urin ($3 \times t_{1/2}$ obat), yaitu pada penelitian ini dilakukan selama 10 jam.

3.4.6 Analisis asam salisilat dalam urin

Sampel urin dikumpulkan dari hewan uji yang diambil pada waktu-waktu tertentu yang telah disebutkan. Data hasil pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk memperoleh jumlah asam salisilat yang diekskresikan dan parameter farmakokinetikanya, yaitu waktu paruh.

3.4.6.1 Pembuatan larutan blanko

Urin blanko, yang tidak mengandung asam salisilat dan agen alkalinisasi/asidisasi pH urin, dipipet 2,0 ml dan dimasukkan ke dalam tabung

sentrifus, lalu disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Setelah itu, bagian jernih yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan direaksikan dengan 4 ml larutan besi (III) amonium sulfat 0,17%. Campuran ini digunakan sebagai larutan blanko dalam analisis.

3.4.6.2 Pembuatan spektrum serapan dan kurva kalibrasi

a. Pembuatan larutan induk

Asam salisilat ditimbang seksama sebanyak 100 mg, dilarutkan dalam aquadest dan dicukupkan volumenya hingga batas labu ukur 50,0 mL. Didapatkan larutan induk asam salisilat dengan konsentrasi 2.000 $\mu\text{g/ml}$.

b. Pembuatan larutan untuk kurva kalibrasi

Larutan induk asam salisilat dipipet sebanyak 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 mL dengan menggunakan pipet volume kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Volumnya dicukupkan dengan urin blanko. Didapatkan larutan asam salisilat dengan konsentrasi 200; 400; 600; 800; 1.000; 1.200 $\mu\text{g/ml}$ yang akan digunakan untuk kurva kalibrasi.

c. Pembuatan spektrum serapan

Larutan asam salisilat 1.000 $\mu\text{g/ml}$ dipipet 1,0 ml dan dimasukkan masing-masing ke dalam tabung sentrifus, lalu disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Setelah itu, bagian jernih yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan direaksikan dengan 2 ml larutan besi (III) amonium sulfat 0,17%. Reaksi tersebut akan menghasilkan kompleks besi (III) salisilat yang berwarna ungu. Setelah didiamkan 20 menit, larutan hasil reaksi tadi diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur blanko dan dilihat panjang gelombang maksimumnya.

d. Pembuatan kurva kalibrasi

Masing-masing larutan untuk kurva kalibrasi dipipet 1,0 ml dan dimasukkan masing-masing ke dalam tabung sentrifus, lalu disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Setelah itu, bagian jernih yang diperoleh

dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan direaksikan dengan 2 ml larutan besi (III) amonium sulfat 0,17%. Reaksi tersebut akan menghasilkan kompleks besi (III) salisilat yang berwarna ungu. Setelah didiamkan 20 menit, larutan hasil reaksi tadi diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur menggunakan blanko pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada pembuatan spektrum serapan.

3.4.6.3 Penanganan spesimen urin

Cuplikan urin dari masing-masing tikus di pipet 1,0 ml dan dimasukkan masing-masing ke dalam tabung sentrifus, lalu disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Setelah itu, bagian jernih yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan direaksikan dengan 2 ml larutan besi (III) amonium sulfat 0,17%. Reaksi tersebut akan menghasilkan kompleks besi (III) salisilat yang berwarna ungu. Setelah didiamkan 20 menit, larutan hasil reaksi tadi diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur blanko pada panjang gelombang maksimumnya.

3.4.6.4 Validasi metode analisis

Pada pengukuran berbagai konsentrasi asam salisilat dalam urin pada kurva kalibrasi, diperoleh data yang dapat digunakan untuk menghitung standar deviasi sebagai validasi metode analisis. Kemudian dapat pula dihitung nilai LOD, dan nilai LOQ.

Data absorbansi dari berbagai variasi konsentrasi asam salisilat dalam urin untuk pembuatan kurva kalibrasi menghasilkan persamaan regresi linear berupa $y = a + bx$, dimana x adalah konsentrasi asam salisilat dan y adalah nilai absorbansi yang terukur. Validasi metode analisis dapat dilihat dari linearitasnya, yaitu dengan menghitung koefisien korelasi dari persamaan garis linear.

Validasi presisi dari metode analisis dapat dilakukan dengan melakukan pengukuran sebanyak enam kali untuk setiap konsentrasi asam salisilat dalam urin, lalu dicatat nilai absorbansi yang terukur. Presisi dihitung melalui simpangan baku relatif atau koefisien variasi dari masing-masing larutan tersebut. Uji perolehan kembali dari data tersebut dapat diperiksa dengan menghitung %

recovery. Sedangkan parameter akurasi dapat diperiksa dengan menghitung perbedaan nilai yang terukur dengan nilai yang sebenarnya (*% diff*).

3.4.6.5 Uji statistik terhadap total asam salisilat yang diekskresikan dalam urin

Data jumlah kumulatif asam salisilat yang diekskresikan dalam urin yang diperoleh diolah secara statistik menggunakan uji normalitas (Uji *Saphiro-Wilk*) dan uji homogenitas (Uji *Levene*). Bila data terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan analisis ANAVA satu arah untuk melihat perbedaan antar kelompok. Jika terdapat perbedaan secara bermakna, maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT). Apabila data yang diperoleh tidak terdistribusi secara normal atau homogen, analisis data dilanjutkan dengan metode uji nonparametrik. Metode uji nonoparametrik yang digunakan adalah uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney* (Besral, 2010).

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Pendahuluan

4.1.1 Uji urinasi pada tikus

Uji ini dilakukan dengan memberikan air hangat ($30^{\circ} - 40^{\circ}\text{C}$) sebanyak 5 ml setiap 1 jam; 1,5 jam; 2 jam pada hewan uji, kemudian dicatat waktu urinasi dan volume urin yang dihasilkan. Selanjutnya ditentukan waktu-waktu pengambilan cuplikan urin untuk dianalisis. Hasil uji pendahuluan urinasi pada tikus, didapatkan bahwa pemberian air hangat ($30^{\circ} - 40^{\circ}\text{C}$) sebanyak 5 ml setiap 1 jam menghasilkan waktu urinasi dan volume urin yang paling optimum untuk analisis dengan volume urin rata-rata $\geq 1,0$ ml. Dari uji urinasi ini ditentukan pula waktu pengambilan cuplikan urin pada penelitian ini yaitu pada jam ke-1; 2; 3; 4; 5; dan 10 setelah pemberian obat. Pemberian air hangat pertama kali sebanyak 5 ml / 100 g berat badan tikus dilakukan agar volume urin pada cuplikan pertama yang dihasilkan cukup untuk dianalisis.

4.1.2 Uji alkalinisasi dan asidisasi pH urin pada tikus

Uji ini dilakukan untuk mengetahui besarnya pH urin yang bisa dicapai dengan pemberian agen alkalinisasi dan asidisasi pH urin, waktu yang diperlukan untuk mencapai pH urin tersebut serta lamanya pH urin tersebut dapat bertahan sebelum kembali ke kondisi normal (6,5 - 7,2). Dari hasil uji ini, ditentukan dosis dan frekuensi pemberian agen alkalinisasi dan asidisasi pH urin agar dapat mencapai pH urin yang diinginkan dan menjaganya agar stabil.

Uji alkalinisasi pH urin dilakukan dengan pemberian 3 dosis berbeda dari larutan natrium bikarbonat secara oral. Dosis I yaitu 180 mg/200 g berat badan; dosis II yaitu 270 mg/200 g berat badan; dosis III yaitu 360 mg/200 g berat badan setiap 4 jam. LD₅₀ natrium bikarbonat (4 gram/kg berat badan tikus) harus dipertimbangkan karena hasilnya menunjukkan adanya peningkatan salivasi yang dapat mengganggu analisis (OECD SIDS, 2002b). Hasil uji menunjukkan pH urin menjadi basa setelah 1 jam pemberian natrium bikarbonat dan bertahan selama 6 jam pada kisaran pH 7,9 - 10,7. Oleh karena itu, pada penelitian ini pemberian

natrium bikarbonat dilakukan 1 jam sebelum pemberian asetosal dan pemberiannya dilakukan setiap 6 jam. Diperoleh pula bahwa terdapat peningkatan kebasaaan pH urin pada peningkatan dosis natrium bikarbonat. Natrium bikarbonat lebih dipilih dibanding kombinasi kalium sitrat dan asam sitrat karena dapat diberikan tanpa harus mempertimbangkan diet makanan, yaitu pemberian dilakukan setelah makan dan waktu tidur sehingga tidak dapat digunakan untuk penelitian ini guna menghindari pengaruh makanan terhadap absorpsi obat selama analisis dilakukan.

Pada uji asidisasi pH urin dengan amonium klorida 0,1 mg/g berat badan, hewan uji mengalami keadaan toksik, yaitu badan lemas, salivasi meningkat, bradikardi, dan hiperventilasi dari awal pemberian. Beberapa tikus uji mati setelah beberapa jam pemberian amonium klorida. Kondisi pH urin yang lebih asam dari pH urin normal tidak bisa dicapai dengan dosis ini. Oleh karena itu, diuji pula agen asidisasi pH urin lain, yaitu asam askorbat 1080 mg/hari dalam 3-4 kali pemberian. Pada pemberian awal, diuji dengan menggunakan dosis awal 250 mg dan 500 mg. Pada pemberian dosis awal 250 mg, pH urin yang lebih asam dari pH urin normal tidak tercapai. Sedangkan pada dosis awal 500 mg, pH urin yang dicapai berkisar 5,6-5,9 (sedikit lebih asam dari pH urin normal). Meski demikian, pada pemberian dosis selanjutnya untuk memperoleh stabilitas pH asam yang dibutuhkan tidak dapat dicapai. Alternatif agen asidisasi pH urin lainnya, kalium dihidrogen fosfat, tidak dapat digunakan karena efek samping yang tidak diinginkan, terutama diare, dapat mengganggu cuplikan urin yang diperlukan. Oleh karena itu, kondisi pH urin yang lebih asam dari pH urin normal belum bisa dilakukan pada penelitian ini.

4.1.3 Uji metode analisis dan stabilitas asam salisilat dalam urin secara in vitro

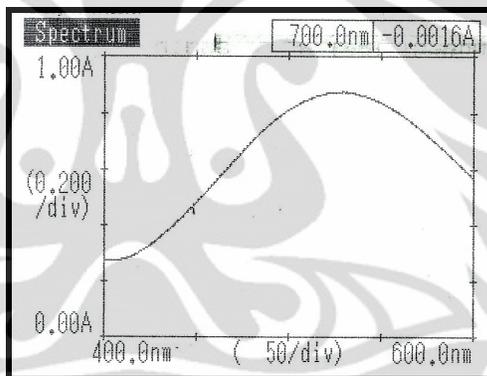
Secara in vitro, asam salisilat dalam urin dapat dianalisis secara spektrofotometri dengan metode kolorimetri sesuai dengan prosedur yang tercantum pada metode penelitian. Pada uji ini diperoleh kurva spektrum serapan yang cukup baik. Pada uji kestabilan diperoleh bahwa urin tidak stabil setelah penyimpanan selama 2 jam pada ketiga suhu penyimpanan, yaitu suhu ruang; suhu *refrigerator*; dan suhu *freezer*. Maka analisis menggunakan spektrofotometer

UV-Vis untuk setiap cuplikan urin dilakukan segera setelah pengambilan cuplikan.

4.2 Analisis Asam Salisilat dalam Urin

4.2.1 Pembuatan spektrum serapan

Panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 530 nm. Panjang gelombang ini sesuai dengan yang diperoleh pada penelitian terdahulu (Siddiqui, Bhatti, Ijaz, Rasheed, dan Saleem, 2003). Kurva spektrum serapan yang diperoleh juga cukup baik dan mirip dengan hasil uji pendahuluan secara *in vitro*. Kurva spektrum serapan ditunjukkan oleh pada Gambar 4.1. Karena bentuk spektrum serapan yang dihasilkan pada panjang gelombang maksimumnya landai, kesalahan penempatan/pembacaan panjang gelombang dapat diabaikan (Harmita, Analisis Kuantitatif dan Bahan Baku Sediaan Farmasi, 2006).



Gambar 4.1 Spektrum serapan asam salisilat dalam urin *in vivo*

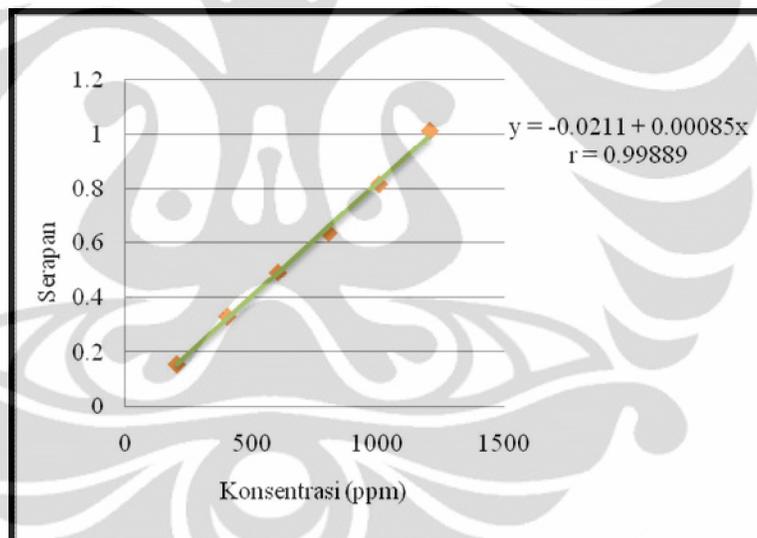
4.2.2 Kurva kalibrasi asam salisilat dalam urin

Asam salisilat ditimbang seksama sebanyak 100,6 mg, kemudian dilarutkan dalam aquadest dan dicukupkan volumenya hingga batas labu ukur 50,0 mL. Didapatkan larutan induk asam salisilat dengan konsentrasi 2.012 $\mu\text{g/ml}$. kemudian larutan induk asam salisilat dipipet sebanyak 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 mL dengan menggunakan pipet volume kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Volumennya dicukupkan dengan urin blanko. Didapatkan larutan asam salisilat dalam urin dengan konsentrasi 201,2; 402,4; 603,6; 804,8; 1.006; 1.207,2 $\mu\text{g/ml}$ yang akan digunakan untuk kurva kalibrasi. Data kurva kalibrasi

asam salisilat dalam urin ditunjukkan pada Tabel 4.1, sedangkan kurva kalibrasi asam salisilat dalam urin ditunjukkan pada Gambar 4.2.

Tabel 4.1 Data kurva kalibrasi asam salisilat dalam urin

C (µg/ml)	Serapan
201.2	0.1547
402.4	0.3286
603.6	0.4918
804.8	0.6362
1006	0.8156
1207.2	1.0128



Gambar 4.2 Kuva kalibrasi asam salisilat dalam urin

Dengan regresi linear, diperoleh persamaan kurva kalibrasi asam salisilat dalam urin, yaitu

$$y = -0,0211 + 0,00085 x \quad (4.1)$$

Variabel x adalah konsentrasi asam salisilat dalam urin dan y adalah serapan yang terukur. Diperoleh harga koefisien korelasi, $r = 0,99889$.

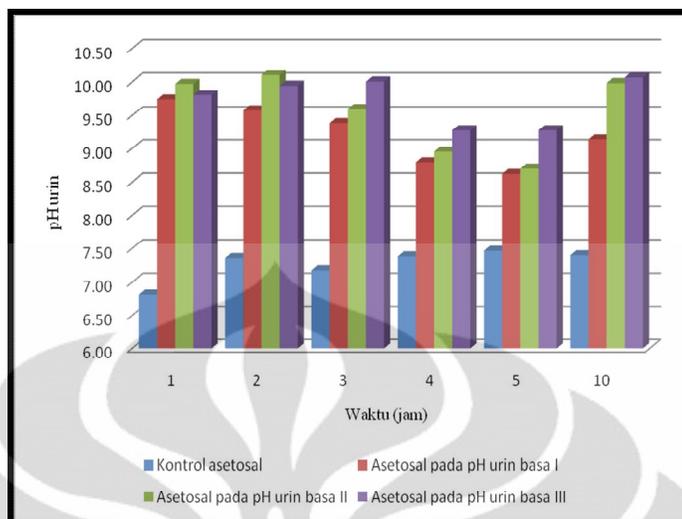
4.3 Pengukuran pH Urin Setiap Cuplikan dari Semua Kelompok Perlakuan

Data pH urin rata-rata setiap cuplikan dari kelompok kontrol asetosal; kelompok asetosal pada pH urin basa I; kelompok asetosal pada pH urin basa II; dan kelompok asetosal pada pH urin basa III ditunjukkan pada Tabel 4.2 Untuk data lengkap pH urin setiap cuplikan dari masing-masing tikus per kelompok dapat dilihat pada Tabel 4.3; 4.4; 4.5; 4.6.

Tabel 4.2 pH urin rata-rata setiap cuplikan dari semua kelompok perlakuan

Tikus kelompok perlakuan		Waktu (jam)					
		1	2	3	4	5	10
Kontrol asetosal	pH urin rata-rata	6.82	7.36	7.17	7.38	7.47	7.40
	Standar deviasi	0.24	0.53	0.24	0.40	0.37	0.46
Asetosal pada pH urin basa I	pH urin rata-rata	9.74	9.58	9.39	8.79	8.62	9.14
	Standar deviasi	0.28	0.65	0.51	0.50	0.71	0.48
Asetosal pada pH urin basa II	pH urin rata-rata	9.97	10.10	9.60	8.95	8.70	9.98
	Standar deviasi	0.30	0.35	0.62	0.59	0.61	0.40
Asetosal pada pH urin basa III	pH urin rata-rata	9.81	9.94	10.00	9.28	9.28	10.07
	Standar deviasi	0.17	0.28	0.30	0.57	0.70	0.32

Dari tabel di atas terlihat bahwa pH urin rata-rata kontrol asetosal lebih kecil dari ketiga kelompok pH urin basa pada setiap cuplikan waktu. Pada kelompok pH urin basa I, pH urin rata-ratanya lebih rendah dari kelompok pH urin basa II. Meskipun demikian, pada kelompok pH urin basa II, pH rata-rata pada setiap waktu cuplikan waktu tidak seluruhnya lebih kecil dari kelompok pH urin basa III, yaitu pada jam ke-1 dan 2. Hal ini mungkin dikarenakan variasi biologis dari hewan uji saat mengkompensasi pemberian larutan natrium karbonat. Untuk lebih jelasnya, grafik cuplikan pH urin rata-rata dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Grafik pH rata-rata cuplikan urin dari semua kelompok perlakuan

Dari Tabel 4.2 juga terlihat bahwa pada ketiga kelompok pH urin basa, ada kenaikan pH urin yang signifikan antara jam ke-5 dengan jam ke-10. Hal ini dikarenakan pemberian natrium bikarbonat setiap 6 jam yang kedua kali bertepatan setelah pengambilan cuplikan urin jam ke-5, maka pH urin kembali naik setelahnya.

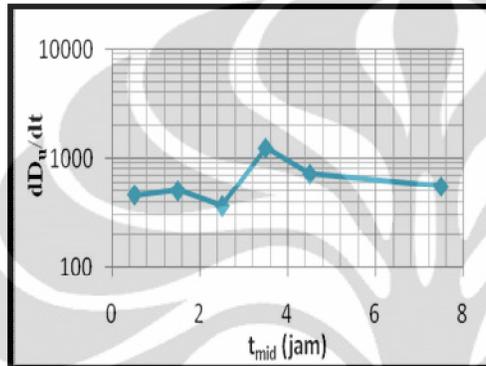
Pada penelitian ini terdapat kesulitan dalam menjaga pH urin agar konstan sesuai dengan yang diinginkan pada setiap waktu pencuplikan. Terdapat kenaikan dan penurunan pH urin setelah pemberian agen alkalinisasi pH urin yang nantinya akan berkaitan dengan jumlah obat yang dikeluarkan di urin.

4.4 Data Cuplikan Urin

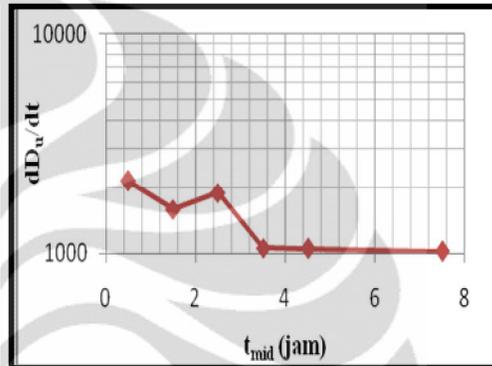
Serapan yang terukur dari setiap cuplikan urin dihitung konsentrasi asam salisilatnya (C_u) menggunakan persamaan 4.1. Kemudian volume setiap cuplikan dicatat (V_u). Jumlah asam salisilat dalam urin (D_u) didapat dengan mengalikan konsentrasi asam salisilat (C_u) dengan volume urin (V_u). Selanjutnya dihitung nilai dD_u/dt dan t_{mid} (waktu tengah) dari setiap cuplikan untuk kemudian digambar secara semilogaritma $\log dD_u/dt$ terhadap t_{mid} (Persamaan 2.10). Data lengkap dari cuplikan urin tiap tikus pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Tabel 4.8; 4.9; 4.10; dan 4.11.

4.4.1 Tinjauan waktu paruh asetosal

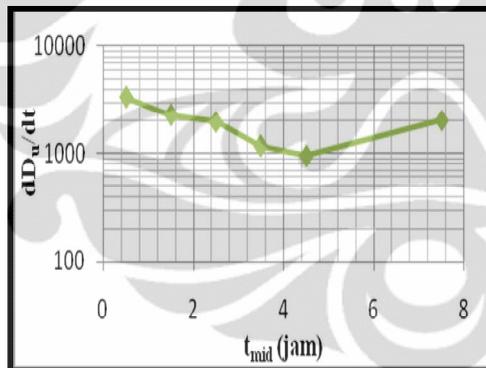
Data urin kelima tikus dalam setiap kelompok dihitung rata-ratanya, kemudian diolah dengan tahapan yang telah dijelaskan di atas dan dibuat grafik semilogaritmanya. Grafik semilogaritma dari data urin rata-rata pada setiap kelompok ditunjukkan pada Gambar 4.4; 4.5; 4.6; 4.7.



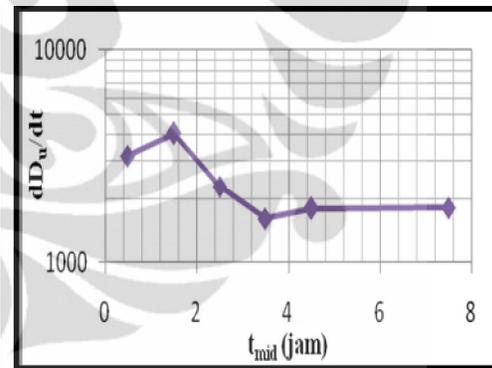
Gambar 4.4



Gambar 4.5



Gambar 4.6



Gambar 4.7

Gambar 4.4; 4.5; 4.6; 4.7 Grafik semilogaritma data urin rata-rata kelompok Kontrol asetosal; Asetosal pada pH urin basa I; Asetosal pada pH urin basa II; Asetosal pada pH urin basa III

Dari keempat grafik di atas, tidak didapatkan grafik semilogaritma dari data urin yang baik. Pada grafik yang baik seharusnya harga log dD_u/dt semakin menurun dengan kenaikan t_{mid} , sehingga didapatkan garis lurus slop untuk menghitung harga K eliminasi (Shargel dan Yu, 1985). Pada keempat grafik di

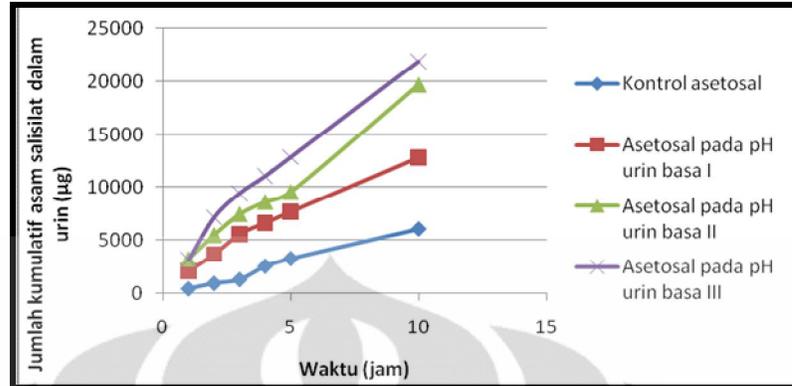
atas harga $\log dD_u/dt$ masih cenderung naik sampai akhir waktu analisis, sehingga tidak bisa didapatkan harga K eliminasi dan waktu paruhnya.

Tidak diperolehnya grafik semilogaritma data urin yang baik disebabkan karena kesulitan dalam meyakinkan bahwa kandung kemih benar-benar telah kosong saat pengambilan cuplikan urin. Pada tikus tidak bisa dilakukan pengosongan kandung kemih saat pengambilan cuplikan urin, sehingga data obat dalam urin pada waktu tersebut menjadi tidak valid dan mempengaruhi grafik yang terbentuk. Selain itu, tikus yang digunakan dalam setiap kelompok juga relatif tidak cukup untuk mendapatkan grafik semilogaritma data urin yang baik karena adanya pengaruh variasi biologis pada masing-masing tikus.

Pada grafik semilogaritma kelompok asetosal pH urin basa II dan III, harga $\log dD_u/dt$ naik pada waktu tengah terakhir. Hal ini mungkin dikarenakan terjadinya kenaikan pH pada waktu tersebut yang menyebabkan jumlah asam salisilat yang dikeluarkan di urin menjadi meningkat, sehingga harga $\log dD_u/dt$ pun meningkat. Dalam pembahasan sebelumnya telah diketahui terdapat kesulitan dalam menjaga konstan pH urin yang diinginkan, sehingga data obat dalam urin juga dipengaruhi.

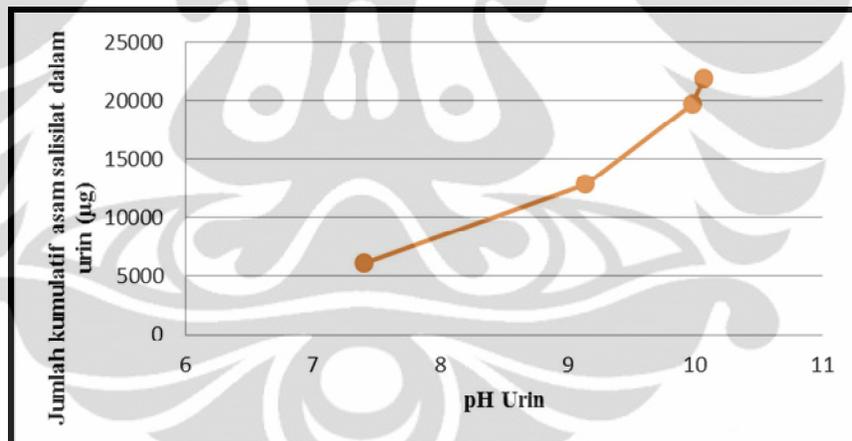
4.4.2 Tinjauan jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin

Dengan memplot jumlah kumulatif rata-rata asam salisilat dalam urin terhadap waktu pada setiap kelompok perlakuan, didapat bahwa semakin tinggi pH urin, jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin juga semakin tinggi. Hal ini dikarenakan pada pH urin yang semakin basa, obat lebih banyak terionisasi, sehingga sedikit direabsorpsi dan banyak diekskresikan dalam urin. Perbandingan jumlah kumulatif rata-rata asam salisilat dalam urin terhadap waktu pada tiap kelompok perlakuan ditunjukkan pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Grafik perbandingan jumlah kumulatif rata-rata asam salisilat dalam urin terhadap waktu pada tiap kelompok perlakuan

Kenaikan jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seiring dengan naiknya pH urin juga ditunjukkan pada Gambar 4.9. Pada gambar tersebut diplot jumlah kumulatif rata-rata asam salisilat dalam urin terhadap pH urin rata-rata pada jam ke-10.



Gambar 4.9 Grafik jumlah kumulatif rata-rata asam salisilat dalam urin terhadap pH urin rata-rata pada jam ke-10

Peningkatan jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin pada pH urin yang semakin basa menunjukkan semakin banyak obat yang dikeluarkan dalam urin, sehingga waktu paruh asetosal pun semakin singkat. Dari hasil ini diperoleh bahwa pH urin yang semakin basa akan mempercepat waktu paruh asetosal, meskipun waktu paruhnya tidak dapat dihitung secara tepat dikarenakan grafik semilogaritma dari data urin yang diperoleh kurang baik.

4.5 Validasi Metode Analisis Asam Salisilat dalam Urin

4.5.1 Uji kecermatan

Parameter uji kecermatan diukur dari enam konsentrasi pada kurva linear standar dengan menghitung perbedaan nilai yang terukur dengan nilai yang sebenarnya (% *diff*). Konsentrasi standar yang digunakan yaitu 201,2; 402,4; 603,6; 804,8; 1.006; 1.207,2 µg/ml. Diperoleh % *diff* dari masing-masing konsentrasi yaitu -2,7945; -2,2395; 0,0312; 3,9147; 2,1518; -0,7582%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.11.

Hasil pengujian kecermatan ini menunjukkan bahwa metode analisis asam salisilat dalam urin memenuhi kriteria cermat yaitu % *diff* tidak boleh menyimpang lebih dari +15% dan -15% (FDA, 2001).

4.5.2 Uji perolehan kembali

Uji ini juga dilakukan pada enam konsentrasi dari kurva linear standar. Berdasarkan perhitungan didapatkan % perolehan kembali dari enam konsentrasi tersebut berturut-turut yakni 102,7950; 102,2395; 99,9688; 96,0852; 97,8482; 100,7582%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.12. Dari hasil pengujian perolehan kembali, metode analisis asam salisilat dalam urin memenuhi kriteria yang dipersyaratkan yaitu 80-120% (Harmita, Analisis Kuantitatif dan Bahan Baku Sediaan Farmasi, 2006).

4.5.3 Linearitas dan rentang

Berdasarkan perhitungan regresi linear diperoleh persamaan garis kurva kalibrasi adalah $y = -0,0211 + 0,00085 x$. Variabel x adalah konsentrasi asam salisilat dalam urin dan y adalah serapan yang terukur. Dari hasil uji linearitas asam salisilat dalam urin dengan rentang konsentrasi 201,2 hingga 1.207,2 µg/ml, diperoleh harga koefisien korelasi, $r = 0,99889$. Harga koefisien korelasi tersebut memenuhi persyaratan uji linearitas untuk sediaan biologis (FDA, 2001). Diperoleh pula harga koefisien variasi fungsi, $V_{x_0}=2,89\%$. Harga ini masih memenuhi persyaratan untuk sediaan biologis yakni $< 5\%$ (Harmita, Analisis Kuantitatif dan Bahan Baku Sediaan Farmasi, 2006). Dapat disimpulkan bahwa

terdapat hubungan yang linear antara konsentrasi asam salisilat dalam urin dengan serapan dalam rentang konsentrasi 201,2 hingga 1.207,2 $\mu\text{g/ml}$.

4.5.4 Batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ)

Berdasarkan persamaan regresi linear kurva kalibrasi, batas deteksi (LOD) asam salisilat dalam urin dihitung dan diperoleh sebesar 61,0753 $\mu\text{g/ml}$. Untuk batas kuantitasi (LOQ) diperoleh sebesar 203,5843 $\mu\text{g/ml}$. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.13.

4.6 Uji Statistik terhadap Jumlah Kumulatif Asam Salisilat yang Diekskresikan dalam Urin

Berdasarkan analisis statistik menggunakan program SPSS 19.0, jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin tidak terdistribusi normal, terutama pada cuplikan urin jam ke-4 kelompok asetosal pada pH urin basa III dan pada jam ke-10 kelompok kontrol asetosal dan kelompok asetosal pada pH urin basa II, dengan nilai $\alpha < 0,05$ (Lihat Lampiran 4). Jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin juga tidak bervariasi secara homogen pada tiap waktu cuplikan urin dengan nilai $\alpha < 0,05$ (Lihat Lampiran 5). Pengujian dilanjutkan dengan uji nonparametrik menggunakan metode uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney*. Dari uji *Kruskal-Wallis* diketahui bahwa terdapat perbedaan signifikan antar kelompok dengan nilai signifikansi $< 0,05$ pada tiap waktu cuplikan urin (Lihat Lampiran 6). Selanjutnya, dari hasil uji *Mann-Whitney* diperoleh bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol asetosal dengan kelompok asetosal pada pH urin basa I; II; III pada setiap waktu cuplikan urin dengan nilai signifikansi $< 0,05$. Sedangkan antara kelompok asetosal pada pH urin basa I dan II terdapat perbedaan bermakna hanya pada jam ke-10. Antara kelompok asetosal pH urin basa I dan III, serta antara kelompok asetosal pH urin basa II dan III tidak terdapat perbedaan bermakna (nilai signifikansi $> 0,05$) pada setiap waktu cuplikan urin (Lihat Lampiran 7).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Jumlah kumulatif asam salisilat yang diekskresikan melalui saluran kemih dipengaruhi oleh pH urin, yakni pada pH urin yang semakin basa (6,82 – 10,10), jumlah asam salisilat yang diekskresikan semakin meningkat. Dengan demikian, waktu paruh asetosal menjadi semakin menurun. Pada pH urin yang bersifat lebih asam dari pH urin normal, percobaan ini tidak dapat dilakukan karena agen asidisasi pH urin yang toksik pada tikus dan tidak menurunkan pH urin secara signifikan.

5.2 Saran

Pada penelitian lebih lanjut, agar dapat dilakukan percobaan pada pH urin yang bersifat lebih asam dari pH urin normal, digunakan agen asidisasi pH urin lain yang tidak toksik dan dapat menurunkan pH urin secara signifikan. Untuk memastikan urin cuplikan yang diambil benar-benar hingga kandung kemih kosong, digunakan kateter. Untuk menjaga pH urin konstan sesuai yang diinginkan pada setiap waktu, dapat diberikan agen asidisasi dan alkalisasi pH urin secara infus intravena. Untuk didapatkan hasil yang lebih baik, digunakan jumlah tikus yang lebih banyak.

DAFTAR ACUAN

- Alfonso, R. G. (1990). *Remington's Pharmaceutical Sciences*. (Ed. ke-18). Washington DC: The Philadelphia College of Pharmacy and Science: 1048-1049.
- AMA Department of Drugs. (1973). *AMA Drug Evaluation*. (Ed. ke-2). Tokyo: Topan Printing Company Limited: 261, 264-265.
- Besral. (2010). *Pengolahan dan Analisa Data-I Menggunakan SPSS*. Depok: Departemen Biostatistika Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Indonesia: 23-30, 58-64.
- Borer, L. L., dan Barry, E. (2000). Experiments with Aspirin. *Journal of Chemical Education Vol. 77 No.3* , 354-355.
- Chem One Corporation. (1999, April 28). *Material Safety Data Sheet: Ammonium Chloride*. 2 Juni 2011.
<http://www.asp-inc.com/products/documents/prodinfo/a/amchlormsd.pdf>
- Dewoto, H. R. (2007). Vitamin dan Mineral. Dalam *Farmakologi dan Terapi (Edisi 5)* (hal. 778). Jakarta: Gaya Baru.
- Drug Facts and Comparisons Pocket Version*. (2007). (Ed. ke-11). USA: Wolters Kluwe Health: 533-537.
- Farmakope Indonesia Ed. ke-4*. (1995). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia: 31, 94, 601.
- FDA. (2001, May). *Guidance for Industry: Analytical Method Validation*. 30 Mei 2011.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>
- Galichet, L. Y., Moffat, A. C., Osselton, M. D., dan Widdop, B (Ed.). (2005). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. [Third Edition] [Computer Software]. Pharmaceutical Press.
- Haretwing-Otto, H. (1983). Pharmacokinetic Consideration of Common Analgesic and Antipyretics. *Analytical Journal Medicine* , 75: 30-37.
- Harmita. (2006). *Analisis Kuantitatif dan Bahan Baku Sediaan Farmasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI Universitas Indonesia: 157-167.

- Harmita. (2006). *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI Universitas Indonesia: 1-32.
- Hollenberg, P. F. (2005). Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination. Dalam K. P. Minneman, dan L. Wecker, *Brody's Human Pharmacology: Molecular to Clinical* (Ed. ke-4) (hal. 27-29, 36). China: Elsevier Mosby.
- Holtzman, S. G., dan Sung, Y.-F. (2005). Drugs to Control Pain. Dalam K. P. Minneman, dan L. Wecker, *Brody's Human Pharmacology: Molecular to Clinical* (Ed. ke-4) (hal. 377-380, 387-390). China: Elsevier Mosby.
- Jin Suk Han, G.-h. K. (1998). Metabolic Acidosis and Urinary Acidification Defect during the Course of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Journal Korean Medical Sciences* , 389-390.
- Lacy, C. F., Armstrong, L. L., Goldman, M. P., dan Lance, L. L. (2005). *Drug Information Handbook*. USA: Lexi-Comp Inc: 102, 164, 147-153, 1375-1376, 1447-1448.
- Material Safety Data Sheet: Ascorbic Acid*. (2005). Texas: Chem One Ltd.
- OECD SIDS. (2002a). *Glycerol*. Paris: UNEP Publications.
- OECD SIDS. (2002b). *Sodium Bicarbonate*. Boston: UNEP Publication.
- Paget, G. E., dan Barnes, J. M. (1964). Interspecies Dosage Conversion Schem in Evaluation of Result and Quantitative Application in Different Species. Dalam B. A. Laurence, *Evaluation of Drug Activities: Pharmacometrics, Vol 1* (hal. 160-162). London: Acamemic Press.
- Rashid, U., Bhatti, H. N., Hanif, M. A., dan Ahmad, N. R. (2006). Determination of Metabolite of Aspirin (Salicyluric Acid) by Colorimetric Method in Human Urine. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9 (6) , 1004-1008.
- Reynolds, J. E. (1982). *Martindale The Extra Phrmacopoeia*. London: The Pharmaceutical Press: 235-242.
- Setiawati, A. (2007). Farmakokinetik Klinik. Dalam Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran – Universitas Indonesia, *Farmakologi dan Terapi* (Ed. ke-5) (hal. 876). Jakarta: Gaya Baru.
- Setiawati, A., Suyatna, F. D., dan Gan, S. (2007). Pengantar Farmakologi. Dalam Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran –

- Universitas Indonesia *Farmakologi dan Terapi* (Ed. ke-5) (hal. 11). Jakarta: Gaya Baru.
- Shargel, L., dan Yu, A. B. (1985). *Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan*. (Ed. ke-2). Terjemahan dari *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, 1985 oleh Fasich, Siti Sjamsiah. Surabaya: Airlangga University Press: 53, 57, 201-220.
- Shearn, M. A. (1986). Obat Antiinflamasi Nonsteroid; Analgesik Nonopiat; Obat yang Digunakan pada Gout. Dalam B. G. Katzung, *Farmakologi Dasar dan Klinik* (Ed. ke-3). Terjemahan dari *Basic and Clinical Pharmacology* oleh Petrus Adrianto. (hal. 474-479). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Siddiqui, B. S., Bhatti, H. N., Ijaz, A., Rasheed, S., dan Saleem, B. (2003). Urinary Excretion of Acetylsalicylic Acid in Healthy Male Volunteers. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6 (16) , 1413-1415.
- Somogyi, A. A. (2005). Clinical Pharmacokinetics and Issues in therapeutics. In K. P. Minneman, dan L. Wecker, *Brody's Human Pharmacology: Molecular to Clinical* (Ed. ke-4) (hal. 46-47). China: Elsevier Mosby.
- Sudjadi, A. R. (2004). *Analisis Obat dan Makanan*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Sukandar, E. Y., Andrajati, R., Sigit, J. I., Adnyana, I. K., Setiadi, A. A., dan Kusnandar. (2008). *ISO Farmakoterapi*. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan: 531-533.
- Trevor, A., Rowland, M., dan Way, E. L. (1972). Techniques for Studying Drug Disposition In Vivo. Dalam B. N. La Du, H. G. Mandel, dan E. L. Way, *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition* (hal. 370). Baltimore, USA: The Williams and Wilkins Company.
- Vane, J. R., dan Botting, R. M. (2003). The Mechanism of Action of Aspirin. *Thrombosis Research* 110 , 255-258.
- WHO. (2008). *Monographs Pharmaceutical Substances*. 2 Juni 2011
WHO Pharmacopoeia Library: <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>
- Wilmana, P. F., dan Gan, S. (2007). Analgesik-Antipiretik Analgesik Antiinflamasi Nonsteroid dan Obat Gangguan Sendi Lainnya. Dalam Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran –

Universitas Indonesia *Farmakologi dan Terapi* (Ed. ke-5) (hal. 230-237).
Jakarta: Gaya Baru.

Wirth, A. C., dan Jarett, L. (1980). *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and
Diagnosis*. St. Louis: C.V. Mosby.







Gambar 3.1 Tikus *Sprague Dawley* berumur 4 bulan



Gambar 3.2 pH meter (Eutech Instrument pH 510)



Gambar 3.3 Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1601)



Gambar 3.4 Sentrifugator (Kubota 5100)



**Gambar 3.5
Bagian dalam sentrifugator
(Kubota 5100)**



Gambar 3.7 Kandang metabolisme



Tabel 4.3 Data pH cuplikan urin pada kelompok kontrol asetosal

Tikus	Waktu (jam)					
	1	2	3	4	5	10
I	6,77	6,87	7,44	7,30	7,35	7,56
II	7,00	6,85	6,83	7,69	7,32	6,80
III	7,13	8,13	7,34	7,89	7,80	8,05
IV	6,56	7,52	7,10	7,00	7,88	7,41
V	6,63	7,42	7,14	7,03	6,98	7,18
Rata-rata	6,82	7,36	7,17	7,38	7,47	7,40
Standar deviasi	0,24	0,53	0,24	0,40	0,37	0,46

Tabel 4.4 Data pH cuplikan urin pada kelompok asetosal pada pH urin basa I

Tikus	Waktu (jam)					
	1	2	3	4	5	10
I	10,12	10,10	9,46	8,94	9,42	9,44
II	9,70	9,93	9,78	9,59	9,30	8,36
III	9,44	9,32	9,34	8,65	8,16	9,00
IV	9,53	8,55	8,55	8,30	8,40	9,34
V	9,92	9,99	9,80	8,48	7,81	9,55
Rata-rata	9,74	9,58	9,39	8,79	8,62	9,14
Standar deviasi	0,28	0,65	0,51	0,50	0,71	0,48

Tabel 4.5 Data pH cuplikan urin pada kelompok asetosal pada pH urin basa II

Tikus	Waktu (jam)					
	1	2	3	4	5	10
I	10,04	10,49	10,19	9,61	9,28	9,39
II	9,90	9,82	8,88	8,99	9,26	9,85
III	9,76	10,05	9,36	8,50	8,50	10,05
IV	9,70	9,72	9,26	8,23	7,80	10,18
V	10,46	10,42	10,30	9,43	8,64	10,45
Rata-rata	9,97	10,10	9,60	8,95	8,70	9,98
Standar deviasi	0,30	0,35	0,62	0,59	0,61	0,40

Tabel 4.6 Data pH cuplikan urin pada kelompok asetosal pada pH urin basa III

Tikus	Waktu (jam)					
	1	2	3	4	5	10
I	9,91	10,06	10,00	9,01	9,31	9,82
II	10,02	9,65	9,76	10,30	10,20	9,66
III	9,61	9,95	9,93	9,05	8,27	10,19
IV	9,84	10,34	10,52	9,08	9,50	10,43
V	9,66	9,72	9,81	8,94	9,10	10,23
Rata-rata	9,81	9,94	10,00	9,28	9,28	10,07
Standar deviasi	0,17	0,28	0,30	0,57	0,70	0,32

Tabel 4.7 Data cuplikan urin kelompok kontrol asetosal

Tikus I							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,1057	149,1765	2,2	328,1882	328,1882	0,5	328,1882
2	0,1754	231,1765	0,5	115,5882	115,5882	1,5	443,7765
3	0,1483	199,2941	3,8	757,3176	757,3176	2,5	1201,0941
4	0,1470	197,7647	4,6	909,7176	909,7176	3,5	2110,8118
5	0,0896	130,2353	6,8	885,6000	885,6000	4,5	2996,4118
10	0,1669	221,1765	15,8	3494,5882	698,9176	7,5	6491,0000
Tikus II							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,0784	117,0588	1,2	140,4706	140,4706	0,5	140,4706
2	0,0248	54,0000	1,2	64,8000	64,8000	1,5	205,2706
3	0,0594	94,7059	0,8	75,7647	75,7647	2,5	281,0353
4	0,4536	558,4706	1,8	1005,2471	1005,2471	3,5	1286,2824
5	0,1809	237,6471	2,2	522,8235	522,8235	4,5	1809,1059
10	0,0686	105,5294	15,0	1582,9412	316,5882	7,5	3392,0471
Tikus III							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,1156	160,8235	4,2	675,4588	675,4588	0,5	675,4588
2	0,2570	327,1765	0,9	294,4588	294,4588	1,5	969,9176
3	0,0912	132,1176	4,0	528,4706	528,4706	2,5	1498,3882
4	0,1449	195,2941	5,2	1015,5294	1015,5294	3,5	2513,9176
5	0,1545	206,5882	5,6	1156,8941	1156,8941	4,5	3670,8118
10	0,1501	201,4118	12,0	2416,9412	483,3882	7,5	6087,7529

Tikus IV							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,0623	98,1176	3,8	372,8471	372,8471	0,5	372,8471
2	0,1156	160,8235	6,8	1093,6000	1093,6000	1,5	1466,4471
3	0,0350	66,0000	4,2	277,2000	277,2000	2,5	1743,6471
4	0,1514	202,9412	6,6	1339,4118	1339,4118	3,5	3083,0588
5	0,1260	173,0588	2,2	380,7294	380,7294	4,5	3463,7882
10	0,1693	224,0000	14,2	3180,8000	636,1600	7,5	6644,5882
Tikus V							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,0359	67,0588	7,8	523,0588	523,0588	0,5	523,0588
2	0,0659	102,3529	5,0	511,7647	511,7647	1,5	1034,8235
3	0,0894	130,0000	1,8	234,0000	234,0000	2,5	1268,8235
4	0,2279	292,9412	3,4	996,0000	996,0000	3,5	2264,8235
5	0,0549	89,4118	4,8	429,1765	429,1765	4,5	2694,0000
10	0,1689	223,5294	14,6	3263,5294	652,7059	7,5	5957,5294
Rata-rata							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,0796	118,4471	3,8	454,8367	454,8367	0,5	454,8367
2	0,1277	175,1059	2,9	504,3049	504,3049	1,5	959,1416
3	0,0847	124,4235	2,9	363,3167	363,3167	2,5	1322,4584
4	0,2250	289,4824	4,3	1250,5638	1250,5638	3,5	2573,0221
5	0,1212	167,3882	4,3	723,1172	723,1172	4,5	3296,1393
10	0,1448	195,1294	14,3	2794,2532	558,8506	7,5	6090,3925

Tabel 4.8 Data cuplikan urin kelompok asetosal pada pH urin basa I

Tikus I							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,1371	186,1176	2,6	483,9059	483,9059	0,5	483,9059
2	0,8933	1075,7647	1,4	1506,0706	1506,0706	1,5	1989,9765
3	1,3232	1581,5294	1,7	2688,6000	2688,6000	2,5	4678,5765
4	0,4893	600,4706	3,1	1861,4588	1861,4588	3,5	6540,0353
5	0,5082	622,7059	1,2	747,2471	747,2471	4,5	7287,2824
10	0,3959	490,5882	16,0	7849,4118	1569,8824	7,5	15136,6941
Tikus II							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,1118	156,3529	5,0	781,7647	781,7647	0,5	781,7647
2	0,2617	332,7059	0,8	266,1647	266,1647	1,5	1047,9294
3	0,3785	470,1176	1,2	564,1412	564,1412	2,5	1612,0706
4	0,3301	413,1765	1,6	661,0824	661,0824	3,5	2273,1529
5	0,4266	526,7059	1,6	842,7294	842,7294	4,5	3115,8824
10	0,2878	363,4118	11,8	4288,2588	857,6518	7,5	7404,1412
Tikus III							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,2865	361,8824	6,4	2316,0471	2316,0471	0,5	2316,0471
2	0,0968	138,7059	2,6	360,6353	360,6353	1,5	2676,6824
3	0,1844	241,7647	3,8	918,7059	918,7059	2,5	3595,3882
4	0,1543	206,3529	2,6	536,5176	536,5176	3,5	4131,9059
5	0,1517	203,2941	4,8	975,8118	975,8118	4,5	5107,7176
10	0,2926	369,0588	14,4	5314,4471	1062,8894	7,5	10422,1647

Tikus IV							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,4158	514,0000	7,4	3803,6000	3803,6000	0,5	3803,6000
2	0,2068	268,1176	9,0	2413,0588	2413,0588	1,5	6216,6588
3	0,1637	217,4118	5,0	1087,0588	1087,0588	2,5	7303,7176
4	0,1406	190,2353	3,8	722,8941	722,8941	3,5	8026,6118
5	0,0884	128,8235	3,6	463,7647	463,7647	4,5	8490,3765
10	0,2339	300,0000	14,2	4260,0000	852,0000	7,5	12750,3765
Tikus V							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,7421	897,8824	3,8	3411,9529	3411,9529	0,5	3411,9529
2	0,5044	618,2353	2,5	1545,5882	1545,5882	1,5	4957,5412
3	0,3156	396,1176	4,6	1822,1412	1822,1412	2,5	6779,6824
4	0,2689	341,1765	4,0	1364,7059	1364,7059	3,5	8144,3882
5	0,1694	224,1176	4,2	941,2941	941,2941	4,5	9085,6824
10	0,3674	457,0588	8,0	3656,4706	731,2941	7,5	12742,1529
Rata-rata							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,3387	423,2471	5,0	2133,1652	2133,1652	0,5	2133,1652
2	0,3926	486,7059	3,3	1586,6612	1586,6612	1,5	3719,8264
3	0,4731	581,3882	3,3	1895,3256	1895,3256	2,5	5615,1520
4	0,2766	350,2824	3,0	1057,8527	1057,8527	3,5	6673,0047
5	0,2689	341,1294	3,1	1050,6786	1050,6786	4,5	7723,6833
10	0,3155	396,0235	12,9	5100,7831	1020,1566	7,5	12824,4664

Tabel 4.9 Data cuplikan urin kelompok asetosal pada pH urin basa II

Tikus I							
t (jam)	A	C_u ($\mu\text{g/ml}$)	V_u (ml)	D_u (μg)	dD_u/dt	t_{mid} (jam)	D_u kumulatif (μg)
1	0,1639	217,6471	3,6	783,5294	783,5294	0,5	783,5294
2	0,6287	764,4706	0,8	611,5765	611,5765	1,5	1395,1059
3	1,8696	2224,3529	1,0	2224,3529	2224,3529	2,5	3619,4588
4	0,4794	588,8235	3,6	2119,7647	2119,7647	3,5	5739,2235
5	0,2539	323,5294	2,6	841,1765	841,1765	4,5	6580,4000
10	0,7424	898,2353	11,0	9880,5882	1976,1176	7,5	16460,9882
Tikus II							
t (jam)	A	C_u ($\mu\text{g/ml}$)	V_u (ml)	D_u (μg)	dD_u/dt	t_{mid} (jam)	D_u kumulatif (μg)
1	0,3289	411,7647	3,6	1482,3529	1482,3529	0,5	1482,3529
2	0,6493	788,7059	3,6	2839,3412	2839,3412	1,5	4321,6941
3	0,8055	972,4706	2,4	2333,9294	2333,9294	2,5	6655,6235
4	0,3319	415,2941	2,4	996,7059	996,7059	3,5	7652,3294
5	0,2698	342,2353	3,6	1232,0471	1232,0471	4,5	8884,3765
10	0,3062	385,0588	14,5	5583,3529	1116,6706	7,5	14467,7294
Tikus III							
t (jam)	A	C_u ($\mu\text{g/ml}$)	V_u (ml)	D_u (μg)	dD_u/dt	t_{mid} (jam)	D_u kumulatif (μg)
1	0,8751	1054,3529	9,8	10332,6588	10332,6588	0,5	10332,6588
2	0,8230	993,0588	2,0	1986,1176	1986,1176	1,5	12318,7765
3	0,4543	559,2941	1,6	894,8706	894,8706	2,5	13213,6471
4	0,2971	374,3529	2,6	973,3176	973,3176	3,5	14186,9647
5	0,2201	283,7647	2,8	794,5412	794,5412	4,5	14981,5059
10	1,2274	1468,8235	10,4	15275,7647	3055,1529	7,5	30257,2706

Tikus IV							
t (jam)	A	C_u ($\mu\text{g/ml}$)	V_u (ml)	D_u (μg)	dD_u/dt	t_{mid} (jam)	D_u kumulatif (μg)
1	0,5426	663,1765	8,6	5703,3176	5703,3176	0,5	5703,3176
2	0,5670	691,8824	3,2	2214,0235	2214,0235	1,5	7917,3412
3	0,2300	295,4118	2,8	827,1529	827,1529	2,5	8744,4941
4	0,1652	219,1765	3,8	832,8706	832,8706	3,5	9577,3647
5	0,1041	147,2941	4,6	677,5529	677,5529	4,5	10254,9176
10	0,5382	658,0000	11,0	7238,0000	1447,6000	7,5	17492,9176
Tikus V							
t (jam)	A	C_u ($\mu\text{g/ml}$)	V_u (ml)	D_u (μg)	dD_u/dt	t_{mid} (jam)	D_u kumulatif (μg)
1	0,4915	603,0588	2,4	1447,3412	1447,3412	0,5	1447,3412
2	1,0343	1241,6471	3,0	3724,9412	3724,9412	1,5	5172,2824
3	0,5206	637,2941	2,6	1656,9647	1656,9647	2,5	6829,2471
4	0,1802	236,8235	3,4	805,2000	805,2000	3,5	7634,4471
5	0,1057	149,1765	5,2	775,7176	775,7176	4,5	8410,1647
10	1,0120	1215,4118	7,5	9115,5882	1823,1176	7,5	17525,7529
Rata-rata							
t (jam)	A	C_u ($\mu\text{g/ml}$)	V_u (ml)	D_u (μg)	dD_u/dt	t_{mid} (jam)	D_u kumulatif (μg)
1	0,4804	590,0000	5,6	3304,0000	3304,0000	0,5	3304,0000
2	0,7405	895,9529	2,5	2257,8014	2257,8014	1,5	5561,8014
3	0,7760	937,7647	2,1	1950,5506	1950,5506	2,5	7512,3520
4	0,2908	366,8941	3,2	1159,3854	1159,3854	3,5	8671,7374
5	0,1907	249,2000	3,8	936,9920	936,9920	4,5	9608,7294
10	0,7652	925,1059	10,9	10065,1520	2013,0304	7,5	19673,8814

Tabel 4.10 Data cuplikan urin kelompok asetosal pada pH urin basa III

Tikus I							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,399	494	4,0	1976,0000	1976	0,5	1976,0000
2	1,522	1815,65	1,2	2178,7765	2178,78	1,5	4154,7765
3	1,206	1444	2,0	2888,0000	2888	2,5	7042,7765
4	0,304	382,824	0,5	191,4118	191,412	3,5	7234,1882
5	1,242	1485,88	1,0	1485,8824	1485,88	4,5	8720,0706
10	0,693	839,765	9,0	7557,8824	1511,58	7,5	16277,9529
Tikus II							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,208	269,412	2,4	646,5882	646,588	0,5	646,5882
2	0,436	537,647	4,6	2473,1765	2473,18	1,5	3119,7647
3	0,452	557,059	3,0	1671,1765	1671,18	2,5	4790,9412
4	1,057	1267,88	1,2	1521,4588	1521,46	3,5	6312,4000
5	0,269	341,059	2,2	750,3294	750,329	4,5	7062,7294
10	0,411	508,235	16,0	8131,7647	1626,35	7,5	15194,4941
Tikus III							
t (jam)	A	C _u (µg/ml)	V _u (ml)	D _u (µg)	dD _u /dt	t _{mid} (jam)	D _u kumulatif (µg)
1	0,508	622,706	9,8	6102,5176	6102,52	0,5	6102,5176
2	1,004	1205,41	5,0	6027,0588	6027,06	1,5	12129,5765
3	0,471	579,294	2,2	1274,4471	1274,45	2,5	13404,0235
4	0,223	287,059	3,8	1090,8235	1090,82	3,5	14494,8471
5	0,145	195,529	5,2	1016,7529	1016,75	4,5	15511,6000
10	0,729	882,588	14,6	12885,7882	2577,16	7,5	28397,3882

Tikus IV							
t (jam)	A	C_u ($\mu\text{g/ml}$)	V_u (ml)	D_u (μg)	dD_u/dt	t_{mid} (jam)	D_u kumulatif (μg)
1	0,337	420,941	9,4	3956,8471	3956,85	0,5	3956,8471
2	0,175	231,176	4,8	1109,6471	1109,65	1,5	5066,4941
3	0,148	199,294	5,4	1076,1882	1076,19	2,5	6142,6824
4	0,147	197,765	4,0	791,0588	791,059	3,5	6933,7412
5	0,09	130,235	3,0	390,7059	390,706	4,5	7324,4471
10	0,167	221,176	12,0	2654,1176	530,824	7,5	9978,5647
Tikus V							
t (jam)	A	C_u ($\mu\text{g/ml}$)	V_u (ml)	D_u (μg)	dD_u/dt	t_{mid} (jam)	D_u kumulatif (μg)
1	0,508	622,235	7,0	4355,6471	4355,65	0,5	4355,6471
2	0,853	1028,71	5,2	5349,2706	5349,27	1,5	9704,9176
3	0,571	696,235	3,8	2645,6941	2645,69	2,5	12350,6118
4	0,275	347,765	6,7	2330,0235	2330,02	3,5	14680,6353
5	0,153	204,588	7,6	1554,8706	1554,87	4,5	16235,5059
10	1,059	1270,82	9,0	11437,4118	2287,48	7,5	27672,9176
Rata-rata							
t (jam)	A	C_u ($\mu\text{g/ml}$)	V_u (ml)	D_u (μg)	dD_u/dt	t_{mid} (jam)	D_u kumulatif (μg)
1	0,392	485,859	6,5	3167,7995	3167,8	0,5	3167,7995
2	0,798	963,718	4,2	4009,0654	4009,07	1,5	7176,8649
3	0,57	695,176	3,3	2280,1788	2280,18	2,5	9457,0438
4	0,401	496,659	3,2	1609,1746	1609,17	3,5	11066,2184
5	0,38	471,459	3,8	1791,5435	1791,54	4,5	12857,7619
10	0,612	744,518	12,1	9023,5539	1804,71	7,5	21881,3158

Tabel 4.11 Data uji kecermatan larutan asam salisilat dalam urin

Konsentrasi asam salisilat ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan	Konsentrasi asam salisilat terukur ($\mu\text{g/ml}$)	% <i>diff</i>
201,2	0,1547	206,8235	-2,7950
402,4	0,3286	411,4118	-2,2395
603,6	0,4918	603,4118	0,0312
804,8	0,6362	773,2941	3,9147
1006	0,8156	984,3529	2,1518
1207,2	1,0128	1216,3529	-0,7582

Tabel 4.12 Data uji perolehan kembali larutan asam salisilat dalam urin

Konsentrasi asam salisilat ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan	Konsentrasi asam salisilat terukur ($\mu\text{g/ml}$)	% Perolehan kembali
201,2	0,1547	206,8235	102,7950
402,4	0,3286	411,4118	102,2395
603,6	0,4918	603,4118	99,9688
804,8	0,6362	773,2941	96,0853
1006	0,8156	984,3529	97,8482
1207,2	1,0128	1216,3529	100,7582

Tabel 4.13 Data pengukuran LOD dan LOQ larutan asam salisilat dalam urin

Konsentrasi asam salisilat ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan	Serapan'	$(\text{Serapan} - \text{Serapan}')^2$
201,2	0,1547	0,1499	0,000022848
402,4	0,3286	0,3209	0,000058676
603,6	0,4918	0,4920	0,000000026
804,8	0,6362	0,6630	0,000717168
1006	0,8156	0,8340	0,000338560
1207,2	1,0128	1,0050	0,000060528

Simpangan baku residual, $S(y/x)$ = 0,017304667

Batas deteksi, LOD = 61,0753 $\mu\text{g/ml}$

Batas kuantitasi, LOQ = 203,5843 $\mu\text{g/ml}$

Standar deviasi dari fungsi, S_{x_0} = 20,3584

Koefisien variasi dari fungsi, V_{x_0} = 2,89%



Lampiran 1. Surat keterangan tikus *Sprague Dawley*

	<p>BAGIAN PRODUKSI TERNAK DAGING KERJA DAN ANEKA TERNAK DEPARTEMEN ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN FAKULTAS PETERNAKAN INSTITUT PERTANIAN BOGOR</p>
	<p>Sekretariat : Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680 Telepon : (0251) 8624774, Fax. (0251) 8624774</p>
<p><u>SURAT KETERANGAN</u></p>	
<p>Yang bertanda tangan di bawah ini:</p>	
Nama	: Prof. Dr. Ir. Pollung H. Siagian, MS
Jabatan	: Kepala Bagian Produksi Ternak Daging Kerja Dan Aneka Ternak
Alamat	: Jl. Agatis kampus IPB Darmaga-Bogor Telp. 0251-8624774, Fax. 0251-8624774
<p>Menyatakan bahwa tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) strain <i>Sprague Dawley</i> (SD) yang dikembangkan di Laboratorium Non Ruminansia dan Satwa Harapan, Fakultas, Peternakan IPB, telah memenuhi syarat sebagai hewan uji untuk penelitian atau kegiatan praktikum.</p>	
<p>Demikian surat keterangan ini dibuat dengan sebenar-benarnya.</p>	
<p>Kepala,</p> 	
<p>Prof. Dr. Ir. Pollung H. Siagian, MS NIP. 19460825 197711 1 001</p>	

Lampiran 2. Sertifikat analisis Asetosal

Bogor

PT. BRATACO

HASIL PEMERIKSAAN

Nama Bahan : Acetosal
 No Batch : J 0625/10 (20100207)
 Ex : Yixing City Xingyu
 E.D : 02-2014
 Grade : farma

Jenis Pemeriksaan	Persyaratan FI IV	Hasil
Pemerian	Hablur putih, tidak berbau, rasa asam	Sesuai
Kelarutan	Sukar larut dalam air, mudah larut dalam etanol, dan larut dalam kloroform dan eter	Sesuai
Identifikasi	Panaskan 8% b/v dengan air selama beberapa menit, dinginkan, tambahkan 1 atau 2 tetes besi (III) klorida LP; terjadi warna merah ungu	Sesuai
Zat tak larut Natrium karbonat	Larutkan 500 mg dalam 10 ml larutan natrium karbonat LP hangat; larutan jernih	Sesuai
Susut Pengeringan	Tidak lebih dari 0,5%	0.2%
Kadar	99,5% - 100,5%	99.71%

Kesimpulan : Memenuhi Syarat

Pemeriksa

 Tatang Suhartono
 Analis

Cikarang, 04-08-2010
 Penanggung Jawab

 Dra. Tri Hartati
 Apoteker
 SIK 3836/B

HEAD OFFICE : Jl. Cideng Barat No. 78, Jakarta Pusat 10150, Telp. (021) 3522733 (hunting) Fax. : (021) 3522734, E-mail : bts@brataco.com
 BRANCH OFFICE :
 • JAKARTA : Jl. Mangga Besar V No.5, Jakarta 11180 Telp. (021) 8290113 (hunting) 3 lines) Fax. (021) 6202430
 • BANDUNG : Jl. Boulevard Raya Blok T82 No. 5, Jakarta 14240 Telp. (021) 45846692 94 Fax. (021) 4532615
 • SEMARANG : Jl. Teusara Jakarta No. 77G, Bandung Telp. (022) 6077129, 6030808 Fax. (022) 6031979
 • YOGYA : Jl. Englen, Kalimas No. 19 Telp. (021) 7101277, 7210308 309 Fax. (022) 7210310
 • SURABAYA : Jl. Bhayangkara No. 45, Yogyakarta Telp. (024) 8415272, 8415999 Fax. (024) 8414580
 • MEDAN : Jl. Tidar No. 89, Surabaya Telp. (031) 543349, 515390 Fax. (0274) 543349
 SUB BRANCH OFFICE :
 • TANGERANG : Jl. Iskandar Muda no. 40 B, Medan Telp. (061) 4148272, 4523159 Fax. (061) 4525996
 • BOGOR :
 • CIKARANG :
 • CIREBON :
 • TASIKMALAYA :
 • SOLO :
 • PURWOKERTO :
 • YEGAL :
 • MALANG :
 • SIDHARJO :
 • DENPASAR :
 • PALEMBANG :
 • MAKASSAR

The Nationwide Chemicals and Ingredients Distributor

Lampiran 3. Cara perhitungan validasi metode analisis

- a. Cara perhitungan uji kecermatan (% *diff*) dan perolehan kembali (% *recovery*)

Persamaan kurva kalibrasi: $y = a + bx$

$$\% \text{ diff} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{b}{a} \times 100\%$$

a = konsentrasi asam salisilat yang sebenarnya

b = konsentrasi asam salisilat yang diperoleh (terukur)

- b. Cara perhitungan LOD dan LOQ serta koefisien variasi dari fungsi

$$\text{Simpangan baku residual: } S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum(y-x)^2}{n-2}}$$

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = \frac{3.3 S(y/x)}{b}$$

$$\text{Batas kuantitasi (LOQ)} = \frac{10 S(y/x)}{b}$$

$$\text{Standar deviasi dari fungsi (S}_{x_0}) = \frac{S(y/x)}{b}$$

$$\text{Koefisien variasi dari fungsi (V}_{x_0}) = \frac{S_{x_0}}{\text{rata-rata}}$$

Lampiran 4. Uji normalitas (Uji *Saphiro-Wilk*) terhadap jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji (SPSS 19.0)

Tujuan :

Untuk melihat data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji tiap waktu cuplikan terdistribusi normal atau tidak.

Hipotesis :

Ho = Data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin tikus terdistribusi normal

Ha = Data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin tikus tidak terdistribusi normal

$\alpha = 0,05$

Pengambilan kesimpulan : Ho diterima jika nilai signifikansi $> 0,05$

Ho ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$

Hasil Uji Normalitas

Waktu (jam)	Kelompok perlakuan	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
1	Kontrol asetosal	0,989	5	0,975
	Asetosal pada pH urin basa I	0,897	5	0,392
	Asetosal pada pH urin basa II	0,821	5	0,120
	Asetosal pada pH urin basa III	0,973	5	0,894
2	Kontrol asetosal	0,957	5	0,784
	Asetosal pada pH urin basa I	0,937	5	0,643
	Asetosal pada pH urin basa II	0,971	5	0,880
	Asetosal pada pH urin basa III	0,889	5	0,353
3	Kontrol asetosal	0,883	5	0,324
	Asetosal pada pH urin basa I	0,950	5	0,734
	Asetosal pada pH urin basa II	0,948	5	0,725
	Asetosal pada pH urin basa III	0,869	5	0,264

4	Kontrol asetosal	0,974	5	0,902
	Asetosal pada pH urin basa I	0,894	5	0,379
	Asetosal pada pH urin basa II	0,891	5	0,362
	Asetosal pada pH urin basa III	0,750	5	0,030
5	Kontrol asetosal	0,942	5	0,680
	Asetosal pada pH urin basa I	0,931	5	0,602
	Asetosal pada pH urin basa II	0,904	5	0,435
	Asetosal pada pH urin basa III	0,795	5	0,074
10	Kontrol asetosal	0,743	5	0,026
	Asetosal pada pH urin basa I	0,954	5	0,763
	Asetosal pada pH urin basa II	0,732	5	0,020
	Asetosal pada pH urin basa III	0,876	5	0,293

Hasil:

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan 1 jam :

- Kontrol asetosal = 0,975; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- Asetosal pada pH urin basa I = 0,392; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- Asetosal pada pH urin basa II = 0,120; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- Asetosal pada pH urin basa III = 0,894; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima

Kesimpulan: H_0 diterima sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji pada waktu cuplikan 1,5 jam terdistribusi normal.

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan 2 jam :

- Kontrol asetosal = 0,784; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- Asetosal pada pH urin basa I = 0,643; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- Asetosal pada pH urin basa II = 0,880; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- Asetosal pada pH urin basa III = 0,353; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima

Kesimpulan: H_0 diterima sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji pada waktu cuplikan 2 jam terdistribusi normal.

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan 3 jam :

- a. Kontrol asetosal = 0,324; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- b. Asetosal pada pH urin basa I = 0,734; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- c. Asetosal pada pH urin basa II = 0,725; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- d. Asetosal pada pH urin basa III = 0,264; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima

Kesimpulan: H_0 diterima sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji pada waktu cuplikan 3 jam terdistribusi normal.

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan 4 jam :

- a. Kontrol asetosal = 0,902; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- b. Asetosal pada pH urin basa I = 0,379; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- c. Asetosal pada pH urin basa II = 0,362; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- d. Asetosal pada pH urin basa III = 0,030; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak

Kesimpulan: H_0 tidak semua diterima sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji pada waktu cuplikan 4 jam tidak terdistribusi normal.

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan 5 jam :

- a. Kontrol asetosal = 0,680; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- b. Asetosal pada pH urin basa I = 0,602; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- c. Asetosal pada pH urin basa II = 0,435; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- d. Asetosal pada pH urin basa III = 0,074; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima

Kesimpulan: H_0 semua diterima sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji pada waktu cuplikan 5 jam terdistribusi normal.

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan 10 jam :

- a. Kontrol asetosal = 0,026; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- b. Asetosal pada pH urin basa I = 0,763; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- c. Asetosal pada pH urin basa II = 0,020; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- d. Asetosal pada pH urin basa III = 0,293; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima

Kesimpulan: H_0 tidak semua diterima sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji pada waktu cuplikan 10 jam tidak terdistribusi normal.



Lampiran 5. Uji homogenitas (Uji *Levene*) terhadap jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji (SPSS 19.0)

Tujuan :

Untuk melihat data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji tiap waktu cuplikan terdistribusi homogen atau tidak.

Hipotesis :

Ho = Data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin tikus terdistribusi homogen

Ha = Data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin tikus tidak bervariasi secara homogen

$\alpha = 0,05$

Pengambilan kesimpulan : Ho diterima jika nilai signifikansi $> 0,05$

Ho ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$

Hasil Uji Homogenitas Varians

Waktu (jam)	Levene Statistic	df1	df2	Sig,
1	7,025	3	16	0,003
2	4,850	3	16	0,014
3	4,251	3	16	0,022
4	6,440	3	16	0,005
5	6,041	3	16	0,006
10	5,072	3	16	0,012

Hasil:

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan:

- 1 jam = 0,003; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- 2 jam = 0,014; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- 3 jam = 0,022; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- 4 jam = 0,005; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak

- e. 5 jam = 0,006; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- f. 10 jam = 0,012; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak

Kesimpulan: H_0 ditolak sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji pada seluruh waktu cuplikan jam tidak bervariasi secara homogen.



Lampiran 6. Uji *Kruskal Wallis* terhadap jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji (SPSS 19.0)

Tujuan :

Untuk melihat ada tidaknya perbedaan bermakna data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin antara seluruh kelompok hewan uji tiap waktu cuplikan.

Hipotesis :

Ho = Data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin tikus tidak berbeda secara bermakna

Ha = Data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin tikus berbeda secara bermakna

$\alpha = 0,05$

Pengambilan kesimpulan : Ho diterima jika nilai signifikansi $> 0,05$
Ho ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$

Hasil Uji *Kruskal Wallis*

	1 jam	2 jam	3 jam	4 jam	5 jam	10 jam
Chi-Square	9,937	11,137	12,040	10,909	11,389	14,326
df	3	3	3	3	3	3
Asymp. Sig.	0,019	0,011	0,007	0,012	0,010	0,002

Hasil:

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan:

- a. 1 jam = 0,019; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- b. 2 jam = 0,011; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- c. 3 jam = 0,007; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- d. 4 jam = 0,012; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- e. 5 jam = 0,010; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- f. 10 jam = 0,002; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak

Kesimpulan: Ho ditolak sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji pada seluruh waktu cuplikan jam berbeda secara bermakna.



Lampiran 7. Uji *Mann-Whitney* terhadap jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin seluruh kelompok hewan uji (SPSS 19.0)

Tujuan :

Untuk melihat kelompok hewan uji mana yang mempunyai perbedaan bermakna data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin pada tiap waktu cuplikan.

Hipotesis :

Ho = Data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin tikus tidak berbeda secara bermakna

Ha = Data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin tikus berbeda secara bermakna

$\alpha = 0,05$

Pengambilan kesimpulan : Ho diterima jika nilai signifikansi $> 0,05$
Ho ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$

Hasil Uji Mann-Whitney antara Kelompok Kontrol Asetosal dengan Kelompok Asetosal pada pH Urin Basa I

	1 jam	2 jam	3 jam	4 jam	5 jam	10 jam
Mann-Whitney U	2,000	1,000	1,000	2,000	2,000	0,000
Wilcoxon W	17,000	16,000	16,000	17,000	17,000	15,000
Z	-2,193	-2,402	-2,402	-2,193	-2,193	-2,611
Asymp. Sig.	0,028	0,016	0,016	0,028	0,028	0,009

Hasil:

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan:

- 1 jam = 0,028; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- 2 jam = 0,016; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- 3 jam = 0,016; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- 4 jam = 0,028; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- 5 jam = 0,028; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak
- 10 jam = 0,009; signifikansi $< 0,05$; maka Ho ditolak

Kesimpulan: H_0 ditolak sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin antara kelompok kontrol asetosal dan kelompok asetosal pH urin basa I pada seluruh waktu cuplikan jam berbeda secara bermakna.

Hasil Uji Mann-Whitney antara Kelompok Kontrol Asetosal dengan Kelompok Asetosal pada pH Urin Basa II

	1 jam	2 jam	3 jam	4 jam	5 jam	10 jam
Mann-Whitney U	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Wilcoxon W	15,000	16,000	15,000	15,000	15,000	15,000
Z	-2,611	-2,402	-2,611	-2,611	-2,611	-2,611
Asymp. Sig.	0,009	0,016	0,009	0,009	0,009	0,009

Hasil:

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan:

- a. 1 jam = 0,009; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- b. 2 jam = 0,016; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- c. 3 jam = 0,009; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- d. 4 jam = 0,009; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- e. 5 jam = 0,009; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- f. 10 jam = 0,009; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak

Kesimpulan: H_0 ditolak sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin antara kelompok kontrol asetosal dan kelompok asetosal pH urin basa II pada seluruh waktu cuplikan jam berbeda secara bermakna.

Hasil Uji Mann-Whitney antara Kelompok Kontrol Asetosal dengan Kelompok Asetosal pada pH Urin Basa III

	1 jam	2 jam	3 jam	4 jam	5 jam	10 jam
Mann-Whitney U	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Wilcoxon W	16,000	15,000	15,000	15,000	15,000	15,000
Z	-2,402	-2,611	-2,611	-2,611	-2,611	-2,611
Asymp. Sig.	0,016	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009

Hasil:

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan:

- 1 jam = 0,016; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- 2 jam = 0,009; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- 3 jam = 0,009; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- 4 jam = 0,009; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- 5 jam = 0,009; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak
- 10 jam = 0,009; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak

Kesimpulan: H_0 ditolak sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin antara kelompok kontrol asetosal dan kelompok asetosal pH urin basa III pada seluruh waktu cuplikan jam berbeda secara bermakna.

Hasil Uji Mann-Whitney antara Kelompok Asetosal pada pH Urin basa I dengan
Kelompok Asetosal pada pH Urin Basa II

	1 jam	2 jam	3 jam	4 jam	5 jam	10 jam
Mann-Whitney U	9,000	7,000	6,000	7,000	6,000	1,000
Wilcoxon W	24,000	22,000	21,000	22,000	21,000	16,000
Z	-0,731	-1,149	-1,358	-1,149	-1,358	-2,402
Asymp. Sig.	0,465	0,251	0,175	0,251	0,175	0,016

Hasil:

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan:

- 1 jam = 0,465; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- 2 jam = 0,251; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- 3 jam = 0,175; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- 4 jam = 0,251; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- 5 jam = 0,175; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima
- 10 jam = 0,016; signifikansi $< 0,05$; maka H_0 ditolak

Kesimpulan: H_0 diterima sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin antara kelompok asetosal pH urin basa I dan kelompok asetosal pH urin basa II pada seluruh waktu cuplikan jam tidak berbeda secara bermakna, kecuali pada 10 jam, data antara 2 kelompok tersebut berbeda bermakna.

Hasil Uji Mann-Whitney antara Kelompok Asetosal pada pH Urin basa I dengan
Kelompok Asetosal pada pH Urin Basa III

	1 jam	2 jam	3 jam	4 jam	5 jam	10 jam
Mann-Whitney U	7,000	5,000	5,000	7,000	6,000	4,000
Wilcoxon W	22,000	20,000	20,000	22,000	21,000	19,000
Z	-1,149	-1,567	-1,567	-1,149	-1,358	-1,776
Asymp. Sig.	0,251	0,117	0,117	0,251	0,175	0,076

Hasil:

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan:

- 1 jam = 0,251; signifikansi > 0,05; maka Ho diterima
- 2 jam = 0,117; signifikansi > 0,05; maka Ho diterima
- 3 jam = 0,117; signifikansi > 0,05; maka Ho diterima
- 4 jam = 0,251; signifikansi > 0,05; maka Ho diterima
- 5 jam = 0,175; signifikansi > 0,05; maka Ho diterima
- 10 jam = 0,076; signifikansi > 0,05; maka Ho diterima

Kesimpulan: Ho ditolak sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin antara kelompok asetosal pH urin basa I dan kelompok asetosal pH urin basa III pada seluruh waktu cuplikan jam tidak berbeda secara bermakna.

Hasil Uji Mann-Whitney antara Kelompok Asetosal pada pH Urin basa II dengan
Kelompok Asetosal pada pH Urin Basa III

	1 jam	2 jam	3 jam	4 jam	5 jam	10 jam
Mann-Whitney U	12,000	12,000	11,000	12,000	11,000	10,000
Wilcoxon W	27,000	27,000	26,000	27,000	26,000	25,000
Z	-0,104	-0,104	-0,313	-0,104	-0,313	-0,522
Asymp. Sig.	0,917	0,917	0,754	0,917	0,754	0,602

Hasil:

Nilai signifikansi pada waktu cuplikan:

- 1 jam = 0,917; signifikansi > 0,05; maka Ho diterima
- 2 jam = 0,917; signifikansi > 0,05; maka Ho diterima
- 3 jam = 0,754; signifikansi > 0,05; maka Ho diterima
- 4 jam = 0,917; signifikansi > 0,05; maka Ho diterima

e. 5 jam = 0,754; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima

f. 10 jam = 0,602; signifikansi $> 0,05$; maka H_0 diterima

Kesimpulan: H_0 ditolak sehingga data jumlah kumulatif asam salisilat dalam urin antara kelompok asetosal pH urin basa II dan kelompok asetosal pH urin basa III pada seluruh waktu cuplikan jam tidak berbeda secara bermakna.

