

615.394

843

p e.1

TESIS

PENGARUH VITAMIN C TERHADAP ABSORPSI SENG

SECARA IN VITRO

*(The effect of vitamin C on zinc absorption
as measured by in vitro study)*



JATMIKO SUSILO

G4A.097.006

PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK

PROGRAM PASCASARJANA

UNIVERSITAS DIPONEGORO

SEMARANG

2000

**PENGARUH VITAMIN C TERHADAP ABSORPSI SENG
SECARA IN VITRO**

*(The effect of vitamin C on zinc absorption
as measured by in vitro study)*

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Magister Ilmu Biomedik
Pada Program Pascasarjana Universitas Diponegoro

Oleh :

JATMIKO SUSILO

NIM : G4A.097.006

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG

2000

Lembar pengesahan
TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 24 APRIL 2000

Oleh :

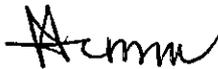
Pembimbing Utama



Prof. Dr. dr. Satoto

NIP. : 130.368.071

Pembimbing



Dra. Henna Rya Sunoko, Apt, MES.

NIP. : 320.002.500

Mengetahui :

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik

Program Pascasarjana Universitas Diponegoro



Prof. Dr. dr. Wahjono, SpPA, FIAC.

130.368.076

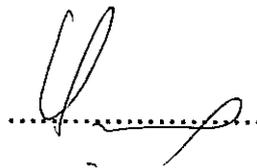
Telah diuji pada

Tanggal : 24 April 2000

PANITIA PENGUJI TESIS

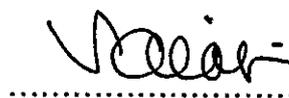
Ketua:

Prof.Dr.dr. Ag. Soemantri, SpAK.

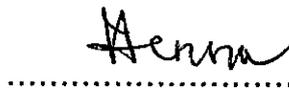


Anggota :

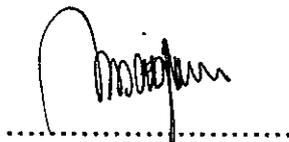
1. Prof.Dr.dr. Satoto



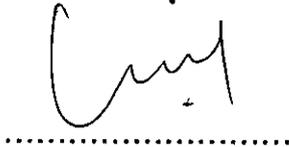
2. Dra. Henna Rya Sunoko,Apt,MES.



3. Dr. M. Masjhoer,SpF,MS.



4. Dr. Wahyu Rochadi,MSc.



Telah diuji pada

Tanggal :24 April 2000

Surat Keputusan Direktur Program Pascasarjana Universitas
Diponegoro Semarang Nomor :55/JK/J.07.4/2000

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof.Dr.dr. Ag. Soemantri,SpAK.

Anggota :

1. Prof.Dr.dr. Satoto
2. Dra. Henna Rya Sunoko,Apt,MES.
3. Dr. Budi Riyanto,MSc,SpPD,K-TI.
4. Dr. M. Masjhoer,SpF,MS.
5. Dr. Wahyu Rochadi,MSc.

UCAPAN TERIMA KASIH

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah swt yang telah memberi bimbingan dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan. Amien.

Pertama-tama perkenankan kami sampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

Direktur Program Pascasarjana, Prof.Dr.dr. Soeharjo HS,SpPD, yang telah memberi kesempatan kepada kami mengikuti pendidikan Program Pascasarjana.

Ketua Program Studi Ilmu Biomedik, Prof.Dr.dr. Tjahjono,SpPA,FIAC, yang telah memberikan kesempatan untuk meningkatkan keilmuan dan dorongan moral.

Pimpinan Muhammadiyah, khususnya Prof.Dr. Abu Su'ud, dr.Shofa Chasani,SpPD dan dr. Tjipta Bahtera,SpAK atas kepercayaan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan ini.

Direktur dan mantan direktur, dr. SM Prihadi,SpOG dan dr. Kusna Hadi,SH, atas ijin yang diberikan untuk bisa berbagi waktu antara tugas dan pendidikan serta rekan sekerja atas kepedulian dan pengertiannya.

Prof.Dr.dr. I. Sudigbia,SpAK, dr. Matdiskan, dr. Endang Ambarwati,SpRM dan dr. Hertanto WS, MS atas asupan, kritik dan saran yang telah diberikan.

Tidak lupa kami ucapkan terima kasih yang tidak terhingga dan penghargaan yang setulus-tulusnya kepada Prof.Dr.dr. Satoto selaku pembimbing utama yang dengan penuh perhatian telah memberi asuh-asah, dorongan, saran, sarana dan prasarana. Kepada Dra. Henna Rya

S, Apt,MES atas saran-saran, ijin penggunaan peralatan laboratorium dan dorongan semangat agar segera menyelesaikan penelitian ini.

Kepada yang terhormat Prof.Dr.dr. Ag. Soemantri,SpAK, dr. Budi Riyanto, MSc,SpPD,K-TI, dr. M Masjhoer,SpF,MS dan dr. Wahyu Rochadi, MSc yang telah memberikan asupan, saran dan kritik.

Pimpinan dan staf laboratorium Bioteknologi atas fasilitas yang diberikan, semoga keberadaan kami selama penelitian berdampak positif dan menjadi stimulan bagi peneliti lain sehingga diharapkan menjadi laboratorium yang representatif sebagaimana yang diidam-idamkan.

Kepala dan staf SMF Theresiana dan rekan dosen Laboratorium Kimia Analisa Akademi Analis Kesehatan Muhammadiyah yang telah memberi fasilitas laboratorium secara sukarela, serta bantuan dan saran. Juga kepada saudara Ida T Hidayat,SH dari PT Otzuka Indonesia yang telah membantu penyediaan larutan ringer, Pak Mono yang telah membantu segala sesuatunya berkaitan dengan pengelolaan ayam, seluruh kerabat dan keluarga yang telah memberikan bantuan moral dan material serta perhatiannya diucapkan banyak terima kasih yang tidak terhingga.

Besar harapan kami, semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi dunia pendidikan dan bagi masyarakat luas. Kami sadar bahwa tesis ini jauh dari kesempurnaan dan kebenaran karena kesempurnaan dan kebenaran hakiki hanya datang dari Allah semata, untuk itu asupan, saran dan kritik yang membangun sangat kami harapkan demi kemajuan dan pengembangan keilmuan kami. Terima kasih.

Wassalamua'alikum Wr.Wb.

Penyusun

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian *Pengaruh vitamin C terhadap absorpsi seng secara in vitro*, bertujuan untuk mengkaji tingkat absorpsi seng dengan adanya penambahan vitamin C. Khususnya mengkaji rekoveri absorpsi seng di dalam usus baik dengan maupun tanpa penambahan vitamin C dan untuk mengetahui jumlah vitamin C yang ditambahkan agar absorpsi seng mencapai optimal.

Metoda yang digunakan adalah modifikasi metoda Wilson-Wiseman dengan menggunakan 35 usus ayam *White leghorn* jantan umur 6 minggu, dibagi dalam lima kelompok perlakuan yaitu penambahan 0, 150, 300, 450 dan 600 mg vitamin C masing-masing pada 220 mg ZnSO₄ dilarutkan dengan larutan Ringer hingga 10,0 ml. Larutan sampel 1,0 ml dimasukkan ke dalam kantong usus sepanjang 10 cm, dicelupkan kedalam larutan Ringer 1.000 ml, dihangatkan pada suhu 37°C selama 60 menit. Cairan bagian luar kantong diambil dan kadar seng ditetapkan secara spektrofotometri metoda Dithizon pada panjang gelombang 535 nm. Kadar dihitung menggunakan kurva baku, $Y=3.679,23 X - 0,019$. Diukur pula pH masing-masing kombinasi ZnSO₄-vitamin C dan pH vitamin C perlakuan.

Kadar rekoveri seng yang diabsorpsi di usus 10,28 ($\pm 2,80$)% dengan waktu absorpsi optimal pada menit ke 60. Dari hasil penelitian diperoleh rata-rata kadar rekoveri seng masing-masing kombinasi 220 mg ZnSO₄ dengan 0,150, 300, 450 dan 600 mg vitamin C adalah 11,82($\pm 0,90$), 15,91($\pm 1,00$), 21,15($\pm 3,93$), 17,57($\pm 3,06$) dan 16,22($\pm 2,42$) %.

Uji statistik menggunakan Anova satu jalan diperoleh $F_{\text{cal}} = 10,36 > F_{\text{tab.}}=2,76$ $\{P=0,05;df=(4,25)\}$, H_0 ditolak, berarti ada perbedaan bermakna antara penambahan dibanding tanpa penambahan vitamin C, tidak ada perbedaan bermakna antara penambahan 150, 450 dan 600 mg, tetapi dengan 300 mg vitamin C memberikan hasil rekovery lebih baik dan berbeda secara bermakna dibanding dengan perlakuan lain.

Dari hasil percobaan tersebut dapat disimpulkan bahwa prosentase seng yang diserap oleh usus sebesar $10,28(\pm 2,80)$ % dengan waktu absorpsi mencapai puncak pada menit ke 60. Vitamin C yang ditambahkan agar absorpsi seng maksimal sebanyak 300 mg, terjadi pada pH 2,47 dan diperoleh kenaikan absorpsi sebesar 178,93%.

ABSTRACT

Key words : Zinc
Ascorbic acid (vitamin C)
Zinc absorption
pH

The objective of this research is to study the level of zinc absorption caused by adding Ascorbic acid (vitamin C) especially to know the percentage of zinc can be absorbed with and without vitamin C addition, and the amount of vitamin C has to be added in order to get an optimal absorption of zinc.

The modification of Wilson-Wiseman's method to study the transport of substances across the intestinal membrane is used in this research. Samples are 35 small intestines of male white leghorn 6 weeks old chicks that are divided into 5 groups. Each group respectively 220 mg ZnSO₄, 220 mg ZnSO₄+150 mg vitamin C, 220 mg ZnSO₄+300 mg vitamin C, 220 mg ZnSO₄+450 mg vitamin C and 220 mg ZnSO₄+600 mg vitamin C diluted in Ringer solution up to 10,0 ml. Fill one ml of dilution sample into 10 cm intestine bag, insert bag into 1.000 ml beaker glass filled by Ringer solution and keep at 37 °C for 60 minutes. Withdraw amount of Ringer solution from the beaker glass and extract with Dithizon reagent then read it in spectrophotometer at 535 nm wavelength and calculates by extrapolating standard curve, $Y = 3.679,23 X - 0,019$. Also reads the pH of each combinations.

Percentage of zinc absorption is approximately 10,28 (±2,80) with the optimal absorption time at 60th minutes. The recovery concentration of zinc are 11,82 (±0,90), 15,91 (±1,00), 21,15

($\pm 3,93$), 17,57 ($\pm 3,06$) and 16,22 ($\pm 2,42$) %. This experiment shows that treatment by vitamin C caused decrease pH solution and affect on increasing zinc absorption.

Statistically, one way Anova give $F_{cal} = 10,36 > F_{tab.} = 2,76$ { $P=0,05$, df (4,25)}. Therefore the hypothesis, H_0 , is rejected. It means that there is significant different between combination with than without vitamin C. Adding 300 mg vitamin C give recovery result significantly better than the others.

The conclusions of this research are (1) zinc absorbed from intestine is $10,28 \pm 2,80$ %; (2) peak time absorption is at 60th minutes; (3) the optimal combination is 220 mg $ZnSO_4$ +300 mg vitamin C and pH optimal is at 2,47; and (4) percentage of increasing recovery is 178,93 %.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
1. PENDAHULUAN	
1.1. Latar belakang permasalahan	1
1.2. Rumusan masalah	3
1.3. Tujuan penelitian	3
1.4. Manfaat penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Absorpsi gastrointestinal	5
2.2. Seng	7
2.3. Interaksi obat	10
3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTEISIS PENELITIAN	
3.1. Kerangka teori	17
3.2. Kerangka konsep	18
3.3. Hipoteisis penelitian	18

4. METODA PENELITIAN	
4.1. Rancangan penelitian	19
4.2. Populasi, sampel dan besar sampel	19
4.3. Definisi operasional variabel	20
4.4. Bahan dan alat	20
4.5. Lokasi peneliiian	22
4.6. Prosedur pengumpulan data	23
4.7. Analisa data	27
5. HASIL DAN ANALISA HASIL PENELITIAN	
5.1. Hasil penelitian	28
5.2. Analisa hasil penelitian	31
6. PEMBAHASAN	36
7. SIMPULAN DAN SARAN	
7.1. Simpulan	42
7.2. Saran	42
8. DAFTAR PUSTAKA	43

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Data kurva baku seng diukur secara spektrofotometer Metoda Dithizon pada panjang gelombang 535 nm	49
Tabel 2 : Data pengaruh waktu terhadap absorbansi seng	49
Tabel 3 : Komposisi rata-rata kombinasi (ZnSO ₄ ·7H ₂ O-vitamin C)	50
Tabel 4 : Data absorbansi seng masing-masing perlakuan	50
Tabel 5 : Data pH larutan kombinasi sebelum perlakuan	51
Tabel 6 : Kadar rekoverti seng setelah melewati dinding usus Selama 60 menit	51
Tabel 7 : Data pH vitamin C dalam 10 ml larutan Ringer	52

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Grafik hubungan kadar Zn baku terhadap absorbansi pada panjang gelombang 535 nm	28
Gambar 2 :Grafik pengaruh waktu terhadap kadar rekoveri Zn	29
Gambar 3 : Grafik pengaruh penambahan vitamin C terhadap kadar rekoveri Zn	30
Gambar 4 : Grafik pH vitamin C dalam larutan Ringer	33
Gambar 5 : Grafik pH kombinasi 220 mg ZnSO ₄ +vitamin C	34
Gambar 6 : Grafik pH kombinasi lawan kadar rekoveri seng	35

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1: Uji regresi dan perhitungan persamaan garis lurus	53
Lampiran 2 : Uji korelasi kadar seng dengan absorbansi	54
Lampiran 3 : Uji normalitas distribusi larutan baku	55
Lampiran 4 : Perhitungan mean pengaruh waktu terhadap kadar recovery seng	56
Lampiran 5 : Uji normalitas distribusi pengaruh waktu terhadap kadar recovery seng	57
Lampiran 6 : Perhitungan mean bobot seng untuk uji	58
Lampiran 7 : Perhitungan mean bobot vitamin C untuk uji	59
Lampiran 8 : Perhitungan pengaruh waktu terhadap kadar recovery seng	60
Lampiran 9 : Perhitungan mean kadar recovery seng	62
Lampiran 10 : Uji Anova satu jalan dan LSD kadar recovery Zn	63
Lampiran 11 : Perhitungan mean pH vitamin C dalam larutan Ringer	65
Lampiran 12 : Uji Anova satu jalan dan LSD pH vitamin C dalam larutan Ringer	67
Lampiran 13 : Uji Anova satu jalan dan LSD pH kombinasi	69

Lampiran 14 : Perhitungan pH mean pH kombinasi sebelum perlakuan	71
Lampiran 15 : Uji normalitas distribusi kadar rekoverti seng	72
Lampiran 16 : Uji normalitas distribusi pH vitamin C dalam larutan Ringer	73
Lampiran 17 : Uji normalitas distribusi pH kombinasi	74

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang masalah

Keefektifan suatu obat sangat ditentukan oleh absorpsi obat tersebut di dalam lumen usus, kecuali obat yang berefek lokal¹. Obat oral di dalam saluran lambung-usus akan diabsorpsi melewati membran dinding sel organ tersebut. Molekul obat umumnya bersifat asam atau basa lemah yang dalam larutan berair akan mengalami disosiasi menjadi ion, sedangkan molekul yang tidak mudah mengalami ionisasi lebih bersifat lipofilik. Kebanyakan obat diabsorpsi melalui difusi pasif yang tergantung nilai pKa obat, pH di dalam usus dan kelarutannya dalam lemak dari bentuk tak-terionisasi². Perubahan pH di dalam usus akan mempengaruhi bentuk ionik-nonionik suatu obat dan obat yang semakin banyak mengalami ionisasi akan semakin sukar menembus membran sel³.

Kajian absorpsi seng intestinal masih menghasilkan pendapat yang bertentangan, mungkin disebabkan adanya perbedaan teknik yang digunakan. Dalam beberapa kajian, duodenum ditetapkan sebagai tempat penyerapan yang paling maksimal, sebaliknya sebagian lainnya menunjukkan terjadi di jejunum dan ileum⁴. Absorpsi seng yang terjadi melalui usus kecil, mungkin paling cepat terjadi di dalam proksimal usus

kecil^{5,6}. Diperkirakan absorpsi seng dari saluran lambung usus antara 10-40%⁵. Studi absorpsi seng pada tikus menunjukkan bahwa hanya 5-10% diet seng diserap secara aktif dengan melawan gradien konsentrasi, utamanya terjadi di duodenum dan segmen distal usus kecil. Disamping itu absorpsi seng juga tergantung pada ligan pengikat logam⁷. Studi lain mengatakan absorpsi seng memerlukan energi dan akan dipercepat oleh sitrat³ yang bersifat asam.

Oleh karena absorpsi seng di usus sangat kecil, maka perlu untuk mengkombinasikan dengan senyawa lain yang diharapkan mampu meningkatkan absorpsinya. Senyawa yang umum digunakan sebagai pengkombinasi antara lain vitamin C (seperti pada kombinasi dengan besi⁸, metampiron⁹) dan vitamin B₆ (dengan sulfamethoksazol¹⁰). Dari sediaan farmasi yang ada terdapat tidak kurang dari 50 macam kombinasi seng dengan vitamin C dan multivitamin lainnya¹¹, hal ini berkaitan dengan sifat dari vitamin C itu sendiri yang mampu mempengaruhi senyawa lain melalui reaksi oksidasi-reduksi, perubahan suasana asam atau membentuk senyawa khelat. Meskipun demikian belum banyak pustaka yang secara jelas menyebutkan interaksi antara seng dengan vitamin C serta seberapa besar pengaruh itu terjadi. Di satu pustaka menyebutkan terjadi peningkatan absorpsi seng⁶, sebaliknya masih diragukan adanya pengaruh itu⁵. Sementara itu, dalam International Congress of Nutrition di Australia tahun 1993 disepakati bahwa sangat

perlu mendapat perhatian dan masih sangat diperlukan informasi lebih lanjut tentang dosis dan pengaruh konstituen lain pada absorpsi¹².

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka sangat perlu untuk diteliti tentang pengaruh penambahan vitamin C berbagai kadar terhadap absorpsi seng.

1.2. Rumusan masalah

Apakah ada pengaruh penambahan vitamin C berbagai kadar terhadap absorpsi seng secara in vitro ?

1.3. Tujuan penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Mengkaji tingkat absorpsi seng dengan adanya penambahan vitamin C berbagai kadar

1.3.2. Tujuan khusus

1. Mengkaji pengaruh pemberian vitamin C terhadap absorpsi seng.
2. Mengetahui jumlah vitamin C yang ditambahkan agar diperoleh absorpsi seng mencapai maksimal

1.4. Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan bermanfaat sebagai acuan penelitian lanjut kombinasi ZnSO₄-vitamin C secara in vivo dan dalam memenuhi asupan seng optimal sesuai dengan kecukupan yang dianjurkan utamanya pada kasus defisiensi seng.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Absorpsi gastrointestinal

Absorpsi merupakan suatu proses perpindahan senyawa kimia dari saluran gastrointestinal melewati dinding lambung usus ke aliran darah dan limfa atau dapat juga didefinisikan sebagai penyerapan zat dari tempat pemberian menuju sirkulasi sistemik². Dalam hal ini tidak ada perbedaan spesifik absorpsi antara obat dan makanan, tetapi ada perbedaan mekanisme absorpsi dan perbedaan pada bagian yang berbeda dari saluran gastrointestinal².

Mekanisme absorpsi obat berupa difusi pasif, transpor konfektif, transpor aktif, transpor fasilitatif, transpor pasangan ion dan pinositosis². Difusi pasif adalah cara transpor suatu zat melewati membran semipermeabel dan obat harus dalam larutan berair pada tempat absorpsi². Molekul kecil dalam larutan berair melarut ke dalam membran fosfolipid dua lapis (membran "bilayer"), melewatinya dan kemudian melarut ke dalam larutan berair pada sisi sebaliknya^{2,13}. Di dalam proses ini tidak ada protein yang terlibat¹³. Kecepatan relatif difusi suatu senyawa melewati membran sebanding dengan gradien konsentrasi^{2,13} dan hidrofobitasnya¹³. Bentuk ion umumnya tidak mempunyai daya larut lemak sehingga tidak mampu menembus membran, sebaliknya senyawa

tak terionisasi larut dalam lemak akan lebih mudah melewatinya. Kebanyakan obat berupa elektrolit yaitu asam lemah dan basa lemah, oleh karena itu pada difusi ini dikarakterisasi oleh pKa senyawa, koefisien partisi minyak-air, pH di dalam dan di luar membran, gradien konsentrasi, luas area dan ketebalan membran serta koefisien difusi². Umumnya absorpsi obat melalui saluran cerna berlangsung secara difusi pasif^{2,14}. Sifat kimiawi $ZnSO_4$ sebagai senyawa yang bersifat amfoter dalam suasana asam organik lemah (vitamin C) diperkirakan akan mengalami difusi pasif.

Pada transpor aktif, suatu senyawa ditranspor dengan diperantarai oleh pembawa yang spesifik². Transpor ini ditandai adanya perlawanan bahwa obat mampu dipindahkan melawan perbedaan kadar (dari rendah ke tinggi)^{2,15} dan dalam hal ion-ion akan melawan potensial elektrokimia². Oleh karena itu sistem ini memerlukan energi^{2,15} dan akan menjadi jenuh jika molekul obat yang ada lebih banyak dibanding pembawa yang tersedia².

Hasil penelitian menunjukkan bahwa absorpsi obat dalam saluran cerna dipengaruhi oleh beberapa faktor yang secara garis besar digolongkan menjadi 2 bagian, yaitu faktor biologis (faktor yang terjadi di tempat absorpsi) dan faktor obat berupa sifat fisiko-kimia dan bentuk sediaan obat^{2,15,16}.

1. Faktor biologis atau fisiologis berupa luas permukaan dan integritas membran lambung usus (gastrointestinal)/ tempat absorpsi^{13,15,16}, kecepatan pengosongan lambung dan motilitas usus^{15,16}, interaksi obat dengan zat yang secara normal berada dalam gastrointestinal^{1,16,17}, aliran darah ke tempat absorpsi^{14,18}, serta nilai pH darah yang mengabsorpsi¹⁴.
2. Faktor fisiko-kimia terutama sifat stereokimia dan kelarutannya^{14,16}, stabilitas obat/sediaan obat¹⁶, pembentukan senyawa kompleks^{16,17,18} dan interaksi dengan senyawa/obat lain (polifarmaka)¹.

II.2. Seng (Zn)

Kecukupan diet seng tidak hanya tergantung pada kuantitas tetapi juga ketersediaannya untuk diabsorpsi¹⁹. Pada studi kinetika tampaknya ada fasilitator yang terlibat dalam absorpsi antara lain kolkalsiferol, mediator endogen leukosit dan prostaglandin E₂⁴. Asam amino tertentu seperti histidin, glutamin, treonin, sistein dan lisin^{4,7}, sitrat, pikolinat dan prostaglandin E₂ telah terbukti meningkatkan absorpsi seng⁴. Sementara itu telah dikaji pula senyawa-senyawa penghambat antara lain Cd, Cu, Ca, Fe⁷, inositol fosfat (fitat) mempunyai efek penghambat absorpsi seng^{6,20}, demikian pula diet serat kedele tak terfermentasi dan tempe^{21,22}. Faktor lain yang juga mampu mempengaruhi absorpsinya adalah logam polivalen^{7,19,23,24}, dan vitamin (vitamin B₆ dan vitamin A, sedangkan

vitamin C masih terjadi beda pendapat yaitu ada pengaruh⁶ dan tidak ada pengaruh baik positif maupun negatif^{5,22}), disamping itu faktor penyakit saluran cerna (misal diare), parasit di usus dapat menyebabkan absorpsi seng berkurang dan pemberian obat yang mampu mengikat seng (misal EDTA)²².

Dalam usus, sel mukosa menjamin dua jalur lintasan bagi seng, dari usus ke darah dan sebaliknya. Yaitu mampu mengeluarkan seng ke dalam usus, sama baiknya dengan pengambilan untuk transfer ke dalam darah. Nampaknya mekanisme homeostatik bekerja mengatur jumlah seng yang masuk tubuh. Seng ekstra (seperti halnya besi) dipegang dalam sel usus dan hanya sejumlah yang diperlukan yang dilepas ke dalam aliran darah. Oleh karena itu status seng individu mempengaruhi prosentase seng yang diabsorpsi dari diet, jika diperlukan lebih banyak maka akan diserap lebih banyak pula²².

Secara biokimiawi, seng telah ditemukan sebagai elemen esensial dalam berbagai spesies dan diperlukan untuk berbagai fungsi kofaktor lebih dari 70 enzim termasuk alkali fosfatase, karbonik anhidrase dan alkohol dehidrogenase yang terlibat dalam sintesa protein, katabolisme protein, dan metabolisme energi³. Pada jaringan tubuh yang berkembang cepat, defisiensi seng menurunkan sintesa DNA, RNA dan protein, dengan demikian menggagalkan pembelahan, pertumbuhan dan

perkembangan seluler²⁵, hipogonadisme, anorexia, malfungsi lambung-usus dan dermatitis³. Seng juga berperan vital dalam perkembangan organ reproduksi, fungsi normal kelenjar prostat dan penyembuhan luka dan terbakar^{5,22}.

Beberapa studi berkaitan dengan defisiensi antara lain tingginya prevalensi "sumbing bibir" patut diduga diakibatkan oleh kekurangan seng²⁶. Menurut studi di Flores dan Timor 1990 ditemukan 39,2% ibu hamil defisiensi seng serum maternal dan 18,2% dari 11 bayi yang dilahirkan mengalami cacat bawaan (sumbing bibir dan microsefal), di Kabupaten dan Kodja Malang dalam periode 1986-1990 ditemukan 275 kasus sumbing bibir²⁶. tetapi permasalahannya tidaklah sesederhana ini bahwa ada faktor lain yang berperan (misalnya tingginya perkawinan antar kerabat dekat) dikaji dari sisi *biomedis* beresiko terhadap kejadian cacat bawaan yang diwariskan secara resesif autosomal meningkat dan faktor kebiasaan atau adat yang lain (seperti minum alkohol, rumah bulat) yang dapat mengganggu absorpsi Zn dan bersifat teratogenik. Studi berkaitan dengan ibu hamil dan status seng di Timor Barat diperoleh 72,1% mengalami defisiensi seng, 6-9 per 1.000 partum insidensi sumbing bibir dan ada hubungan positif bermakna antara defisiensi seng dengan angka perdarahan pasca persalinan²⁷, diduga bahwa Zn pada perdarahan *post partum* mempunyai efek potensiasi terhadap kontraksi uterus melalui deposit kolagen dan *tensile strength of the tissue*,

meskipun mekanismenya belum diketahui secara pasti dan masih diperlukan kajian lanjut berkaitan dengan hubungan antara defisiensi Zn maternal dan perdarahan *post partum* pada tingkat bioseluler /biomolekuler. Dilaporkan pula bahwa dari 179 responden di daerah Manggarai Jakarta terdapat 87,79% mengeluh kekurangan seng yang diduga akibat masukan diet yang kurang, gangguan absorpsi dan banyaknya pengeluaran lewat keringat serta peningkatan kebutuhan karena infeksi²⁸. Penelitian di Kabupaten Bogor pada anak sekolah ditemukan kasus defisiensi seng 27,50%²⁹. Ditemukan pula bahwa suplementasi seng pada anak yang defisiensi berefek pada perbaikan tumbuh kembang dan penurunan kejadian dan kegawatan diare dan ISPA³⁰.

II.3. Interaksi obat

Efektifitas suatu pengobatan yang mempengaruhi respon tubuh antara lain adanya interaksi obat. Obat dapat berinteraksi dengan makanan, zat gizi, zat kimia yang berasal dari luar atau dengan obat lain yang diminum bersamaan^{17,18}. Interaksi obat secara klinik sangat penting bila dikaitkan dengan peningkatan efikasi¹⁷ atau toksisitas dan atau mengurangi efektifitas obat yang berinteraksi¹. Interaksi dapat berakibat menguntungkan seperti adanya sinergisme, addisi atau potensiasi,

sebaliknya dapat merugikan bila meningkatkan toksisitas atau insidensi efek samping¹.

Terjadinya interaksi obat dapat berlangsung melalui tiga mekanisme yaitu (1) interaksi farmasetika atau inkompatibilitas, (2) interaksi farmakokinetika dan (3) interaksi farmakodinamika^{1,17}. Beberapa obat berinteraksi bersama dengan berbagai mekanisme, banyak obat yang berinteraksi tidak hanya melalui satu mekanisme saja tetapi seringkali menggunakan dua atau lebih mekanisme¹⁷.

Pada bahasan ini dititik beratkan pada interaksi farmakokinetika yang dapat mempengaruhi proses absorpsi obat. Kebanyakan interaksi ini terjadi karena suatu peningkatan absorpsi obat di saluran lambung-usus¹⁸ dengan pengaruh berupa :

II.3.1. Interaksi langsung

Interaksi ini berlangsung secara fisika atau kimiawi antar obat dalam lumen usus sebelum proses absorpsi^{1,31}. Kadang-kadang reaksi fisiko-kimia inilah diistilahkan sebagai "interaksi obat"¹⁷.

II.3.2. Kecepatan pengosongan lambung dan motilitas saluran cerna

Oleh karena absorpsi obat sebagian besar terjadi di bagian atas usus halus dan semakin cepat obat sampai ke usus halus semakin cepat

pula absorpsinya. Obat yang mempercepat pengosongan lambung akan mempercepat absorpsi obat lain, semakin lambat motilitas saluran cerna, semakin lama kontak dengan lumen usus akan semakin memperbesar jumlah obat tersebut diabsorpsi^{1,17,18}. Faktor-faktor yang mempengaruhi pengosongan lambung juga mempengaruhi absorpsi obat seperti volume makanan, temperatur makanan, bentuk dan kekentalan makanan. Gerakan atau motilitas usus halus dapat mempengaruhi absorpsi obat. Peristaltik memungkinkan obat kontak lebih erat dengan permukaan usus sehingga memperbesar absorpsi obat. Tetapi meningkatnya motilitas usus halus dapat mengurangi jumlah absorpsi obat, karena kontak obat dengan tempat absorpsi dipercepat gerakannya sehingga obat bergeser dari tempat absorpsinya¹⁶.

II.3.3. Peningkatan aliran darah ke lambung dan usus kecil

Adanya senyawa lain di dalam lambung akan meningkatkan aliran darah yang menuju ke daerah lambung dan usus kecil¹⁸. Semakin cepat sirkulasi aliran darah yang masuk dan meninggalkan dinding serosa usus akan semakin besar jumlah dan laju absorpsi¹⁵.

II.3.4. Perubahan pH cairan saluran cerna

Perjalanan obat melewati membran mukosa dengan difusi pasif tergantung pada tingkat keberadaannya dalam bentuk non-ionik, larut

lemak. Oleh karena itu absorpsi dipengaruhi oleh pKa, kelarutan lemaknya, pH isi usus dan berbagai parameter berkaitan dengan formulasi farmasetik obat¹⁷.

Pemberian suatu obat dapat merubah derajat keasaman cairan lambung-usus^{1,16}. Keasaman (pH) atau lebih tepatnya kadar ion hidrogen (H^+) akan mempengaruhi sifat-sifat fisika dan kimia berkaitan dengan absorpsi, seperti kelarutan obat, koefisien partisi minyak/air dan sebagainya². Obat umumnya bersifat asam atau basa lemah yang dalam larutan berair akan berbentuk ion dan nonion (molekul) tergantung dari pH lingkungan^{2,16}. Besar konsentrasi bentuk ion dan nonion dapat diketahui dengan persamaan *Henderson-Hasselbach*^{2,15,16} sebagaimana persamaan berikut ini :

Untuk senyawa obat bersifat asam lemah berlaku :

$$pH - pKa = \log C_i/C_u$$

Untuk senyawa obat bersifat basa lemah berlaku :

$$pH - pKa = \log C_u/C_i$$

dimana :

pH : derajat keasaman ($pH = -\log H^+$),

Ka : konstanta disosiasi ($pKa = -\log Ka$),

C_u : konsentrasi bentuk nonion dan C_i : konsentrasi bentuk ion.

Dengan demikian obat atau bahan obat yang bersifat asam lemah akan lebih baik diabsorpsi di lambung daripada di usus, karena dalam lambung lingkungannya lebih asam dan konsentrasi nonion obat lebih besar daripada konsentrasi ionnya, sebaliknya untuk obat basa lemah lebih baik diabsorpsi didalam usus daripada di lambung^{2,15}. Pada difusi pasif suatu obat yang melewati gastrointestinal kemungkinan tergantung pH, seperti halnya obat asam lemah akan cepat diabsorpsi karena sebagian besar obat berada dalam keadaan dapat berdifusi cepat, tak-terionisasi dan larut lemak³².

II.3.5. Adsorpsi dan pembentukan senyawa kompleks

Senyawa adsorben, seperti karbon aktif, didalam usus untuk penata laksanaan overdosis atau untuk menghilangkan senyawa toksik lainnya dapat mempengaruhi absorpsi obat pada dosis terapeutik. Pembentukan kompleks dapat terjadi antara bahan obat dengan senyawa penyusun obat atau kombinasi obat lain. Komplek yang terjadi antara lain berkaitan dengan sifat besar molekul, ukuran partikel dan sifat difusinya yang kurang menguntungkan¹⁶. Selain itu beberapa obat dapat membentuk senyawa kompleks dengan obat lain misalnya ion-ion logam dengan tetrasiklin yang tidak hanya diabsorpsi sangat kecil tetapi juga menurunkan efek antibakterinya¹⁷.

II.3.6. Malabsorpsi akibat obat

Beberapa obat yang digunakan untuk terapi spesifik mampu menyebabkan malabsorpsi beberapa komponen penting dari diet, seperti misalnya penggunaan PAS (p-amino salisilat) menyebabkan malabsorpsi lemak dan vitamin B₁₂. Antibiotika neomisin dapat menyebabkan sindrom malabsorpsi, sehingga asupan beberapa obat atau makanan dapat terganggu¹⁷. Juga penggunaan parafin cair sebagai laksansia dapat menyebabkan defisiensi vitamin larut lemak, karena parafin sedikit diabsorpsi dan dengan aksi lokalnya mengambil vitamin larut lemak sehingga mencegah absorpsinya³². Beberapa penyakit digestif dapat menyebabkan penurunan absorpsi suatu zat seperti diare^{23,32}, dan cystic fibrosis menyebabkan penurunan absorpsi besi³².

II.3.7. Interaksi dengan zat gastrointestinal

Zat-zat yang secara normal terdapat dalam gastrointestinal dapat mempengaruhi absorpsi obat, ion H⁺ dan enzim berpengaruh terhadap degradasi beberapa obat seperti ester-ester eritromisin yang secara oral tidak mampu menghasilkan efek terapeutik tetapi efektif diberikan secara parenteral, sebaliknya ester kloramfenikol tidak diabsorpsi dan tidak berdaya bakterisid akan efektif setelah mengalami hidrolisa oleh komponen lambung menjadi bentuk basa¹⁶. Garam empedu yang bersifat

surfaktan akan memperbesar kelarutan obat berdaya larut kecil, berakibat peningkatan daya absorpsi¹⁶.

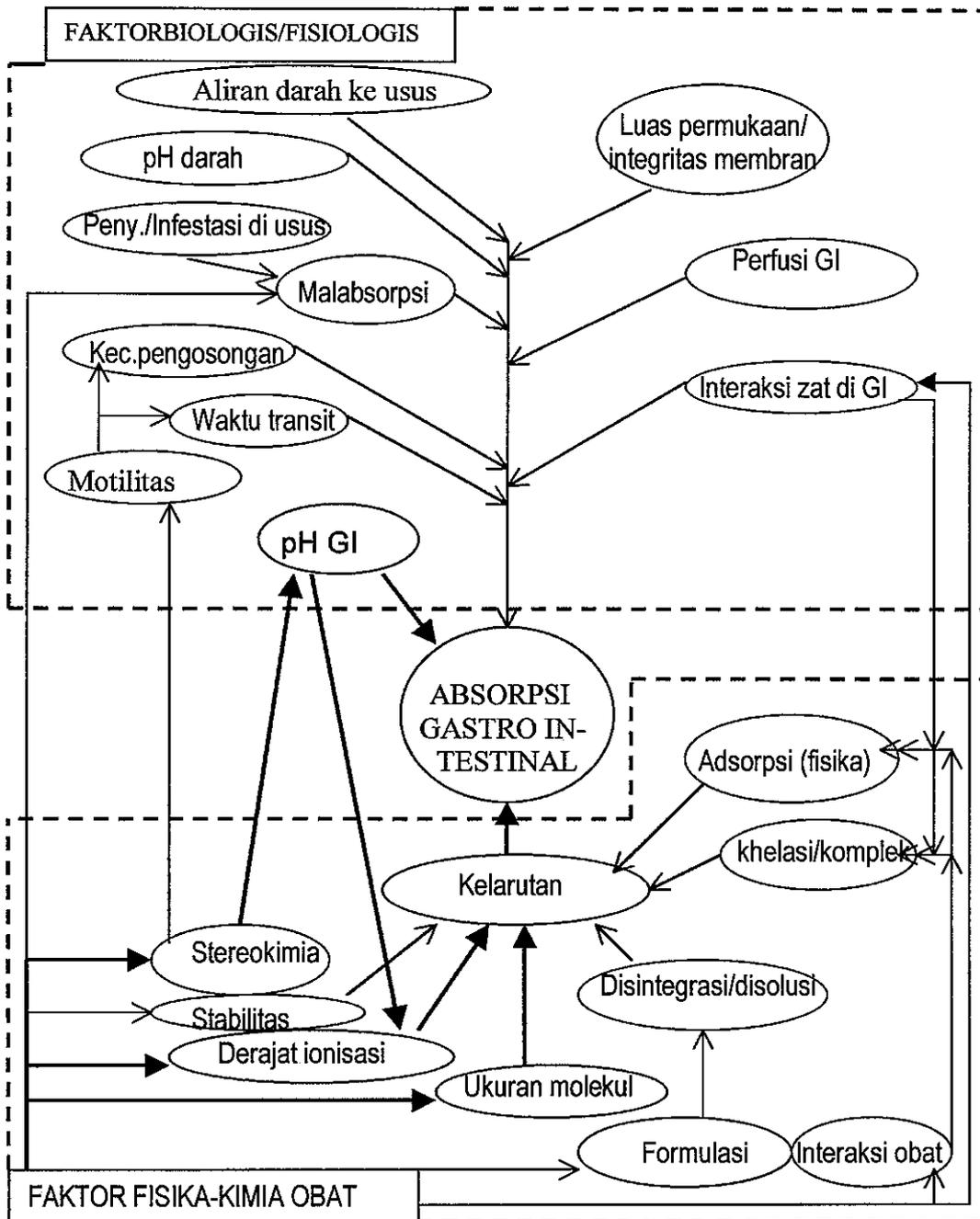
Musin yang terdapat di dalam lambung akan membentuk kompleks yang sukar diabsorpsi misalnya dengan streptomisin, dimana pada keadaan trauma lambung atau iritasi saluran cerna menyebabkan penebalan lapisan musin yang menghalangi absorpsi antibiotika tersebut¹⁶.

Interaksi yang mungkin terjadi antara seng dengan vitamin C diduga kuat berkaitan dengan perubahan pH saluran cerna melalui mekanisme dari sifat vitamin C yang mampu menurunkan pH lingkungan dan pada tahap berikutnya akan menurunkan derajat atau tingkat ionisasi dari $ZnSO_4$ karena $ZnSO_4$ itu sendiri mempunyai derajat keasaman rendah (pH = 4,5) sehingga bentuk tak-terionisasi lebih banyak, kelarutan dalam lemak lebih tinggi. Di samping itu $ZnSO_4$ yang bersifat amfoter dengan energi potensial yang sangat kecil (daya pengoksidasi sangat kecil) berinteraksi dengan vitamin C, yang mempunyai daya mereduksi kuat, diduga mampu mempengaruhi absorpsi melalui perbedaan potensial di antara ke dua sisi membran dan mekanisme lain yang dimungkinkan melalui pembentukan senyawa kompleks/khelat, meskipun kedua mekanisme absorpsi terakhir ini sangat kecil kemungkinannya.

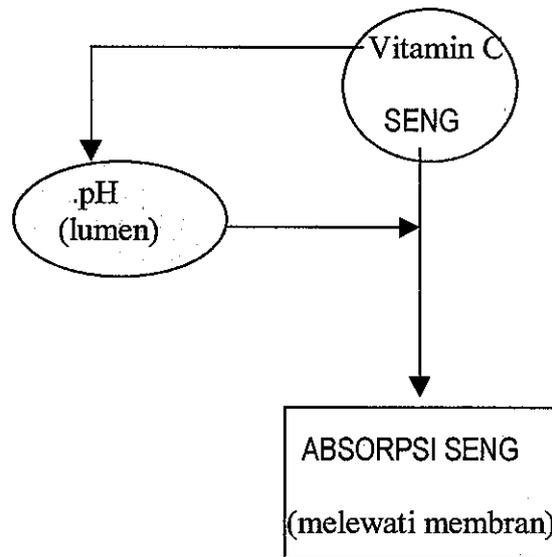
BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

III.1. Kerangka teori



II.2. Kerangka konsep



III.3. Hipotesa Penelitian

III.3.1. Hipotesa mayor :

Ada pengaruh vitamin C terhadap kenaikan absorpsi seng

III.3.2. Hipotesa minor :

Ada pengaruh vitamin C terhadap penurunan pH larutan

Ada pengaruh penurunan pH terhadap kenaikan absorpsi seng

BAB IV

METODA PENELITIAN

IV.1. Rancangan eksperimen

Rancangan eksperimen yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana (Post test only control group design)^{33,34,35}.

IV.2. Populasi, sampel dan besar sampel

Besar sampel dihitung dengan rumus : $(n-1)(t-1) \geq 15$.

dimana n : jumlah sampel dan t : jumlah perlakuan.

$$(n-1)(5-1) \geq 15. \quad \longrightarrow \quad n \geq 5$$

Jadi jumlah minimal sampel tiap perlakuan adalah 5 sampel

Sampel sebanyak lebih kurang 35 usus ayam *white leghorn* jantan umur 6 minggu dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok masing-masing terdiri dari 7 anggota.

Perlakuan {Penambahan vitamin C (mg) pada 220 mg ZnSO ₄ }				
0	150	300	450	600
X ₁	X ₁	X ₁	X ₁	X ₁
X ₂	X ₂	X ₂	X ₂	X ₂
X _{nA1}	X _{nA2}	X _{nA3}	X _{nA4}	X _{nA5}

IV.3. Definisi operasional variabel

IV.3.1. Variabel dependen :

Kadar seng (mg/ml) di dalam serosa diukur dengan spektrofotometri metoda dithizon pada panjang gelombang 535 nm.

IV.3.2. Variabel independen

Penambahan vitamin C seberat 0, 150, 300, 450 dan 600 mg masing-masing pada 220 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

IV.3.3. Variabel perantara

pH larutan kombinasi ($ZnSO_4$ +vitamin C) diukur menggunakan pH meter

IV.4. Bahan dan alat

IV.4.1. Bahan

Usus ayam *white leghorn* jantan umur 6 minggu, vitamin C (pharm), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ pa (E Merck), larutan ringer (Otzuka), akuabides (Ika Pharm), benang bedah (B Braun), natrium asetat anhidrat pa (E Merck), asam asetat glasial pa (E Merck), natrium thiosulfat pa (E Merck), difenilthiokarbazon pa (E Merck), asam klorida pa (E Merck) dan karbon tetraklorida pa (E Merck).

IV.4.2. Alat

Beker gelas 1 l, penangas air termostat-sirkulator (Neslab EX 211), stirer magnet, statif, klem (penggantung), neraca analitik (Mettler AE 200), labu takar 20, 25, 50, 100 ml, pipet volume 1, 5, 10 ml, siring 10 ml, kateter IV, arloji, batang pengaduk, sendok tanduk, "panci" plastik 20x40x10 cm, pisau bedah, gunting stainless, spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu 2101) dan pH meter (HANA intrans 8520).

IV.4.3. Pembuatan pereaksi

1. Larutan baku seng

Dilartukan 100; 112,5; 125; 135; 150 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ dalam 1 ml HCl 1+1, encerkan dengan akuabides

2. Larutan natrium sitrat

Dilartukan 10 g $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ dalam 90 ml akuabides dan ekstraksi dengan larutan dithizon

3. Larutan HCl 1+1

Diencerkan 50 ml HCl pekat dengan akuabides hingga 100 ml

4. Larutan natrium asetat 2N

Dilartukan 67 g $NaC_2H_3O_2$ anhidrat dengan akuabides hingga 250 ml.

5. Larutan asam asetat 1+7

Dilartukan 1 bagian asam asetat glasial dalam 7 bagian akuabides

6. Larutan dapar asetat

Dicampur larutan natrium asetat 2N dengan larutan asam asetat sama banyak

7. Larutan natrium thiosulfat

Dilarutkan 25 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 100 ml akuabides

8. Larutan dithizon I

Dilarutkan 0,1 g difenilthiokarbazon dalam 1:1 CCl_4

9. Larutan dithizon II

Diencerkan 1 bagian larutan dithizon I dalam 9 bagian CCl_4 ³⁶.

10. Larutan uji

Ditimbang vitamin C seberat 0, 325, 750, 1125 dan 1500 mg. Masukkan ke dalam labu takar 25,0 ml, tambahkan kedalam masing-masing labu 550 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, larutkan dengan larutan Ringer hingga 25,0 ml. Ambil 1,0 ml masukkan ke dalam kantong usus yang telah disiapkan.

IV.5. Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan laboratorium Kimia Analisa Akademi Analis Kesehatan Muhammadiyah Semarang.

IV.6. Prosedur pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan dalam 2 tahap yaitu tahap pertama untuk mengkaji waktu absorpsi seng optimal dan pada tahap kedua dilakukan untuk mengkaji pengaruh vitamin C terhadap absorpsi seng.

IV.6.1. Penentuan waktu absorpsi optimal

Dilakukan prosedur IV.6.2. dengan menggunakan larutan uji 750 – 1.300 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ dalam larutan ringer hingga 20,0 ml. Ambil 1,0 ml masukkan kedalam kantong usus. Ambil 10,0 ml larutan sebelah luar (serosa) setelah 15, 30, 45, 60 dan 90 menit³⁷. Lanjutkan prosedur penetapan kadar seng. Bila memungkinkan tentukan puncak (“peak”) menggunakan metoda tangens paralel yaitu dihitung menggunakan derivatif pertama $\delta C/\delta t$ ³⁷.

IV.6.2. Prosedur perlakuan

1. Ayam *white leghorn jantan* yang telah umur 6 minggu disembelih, diambil bulunya, kemudian dibelah pada bagian dada, potong pada bagian bawah tembolok dan usus besar. Diambil. Lalu dimasukkan kedalam larutan ringer.
2. Dipilih bagian usus halus, dihilangkan selaput yang melingkupi dan potong sepanjang 10 cm (mulai dari atas “apendiks”, celupkan ke dalam larutan ringer.

3. Dihubungkan ujung usus terbuka dengan kateter IV-spuit inj, dicuci hati-hati usus dengan menyemprotkan larutan ringer, diambil penyemprot, dicelupkan usus dalam penangas 37°C secara konstan.
4. Diambil usus, segera dikosongkan larutan ringer dengan sedikit meremas.
5. Diikat salah satu ujung dengan benang bedah.
6. Disiapkan benang pengikat di ujung lain, dimasukkan larutan uji 1,0 ml dan diikat kuat-kuat, kemudian benang bedah dipotong beberapa cm untuk menggantung.
7. Dimasukkan kantong usus yang telah diisi larutan uji ke dalam beker berisi larutan ringer bersuhu 37°C, digantung dan dibiarkan kantong membentang kemudian diaduk dengan stirer.
8. Diambil sampel 10,0 ml dari cairan luar kantong (serosa) setelah x menit perlakuan³⁸.
9. Ditetapan kadar seng secara spektrofotometri metoda dithizon³⁶.

IV.6.3. Analisa spektrofotometri metoda dithizon

IV.6.3.1. Kurva kalibrasi ZnSO₄³⁶

1. Diambil 1,0 ml larutan baku ZnSO₄·7H₂O, diencerkan dengan akuabides hingga 25,0 ml. Diambil 1,0 ml diencerkan hingga 25,0 ml. Diambil 1,0 ml diencerkan lagi hingga 25,0 ml dengan akuabides.

2. Dimasukkan kedalam corong pisah 100 ml. Gunakan 25,0 ml akuabides (bebas Zn) sebagai blanko.
3. Ditambahkan ke masing-masing corong 5,0 ml dapar asetat dan 1,0 ml natrium thiosulfat dan gojog.
4. Ditambahkan lagi 5,0 ml larutan dithizon II, ditutup dan gojog kuat-kuat selama 4 menit.
5. Dibiarkan lapisan memisah, ujung corong dikeringkan dan dipisahkan larutan seng-dithizonat yang berwarna hijau kemerahan ke dalam kuvet.
6. Diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 535 nm (pengukuran tidak lebih dari 15 menit setelah direaksikan).
7. Dibuat kurva baku kadar Zn lawan serapan (C vs A). Kemudian dihitung persamaan garis lurus $Y = bX + a$ (dimana $Y = A$: absorbansi dan $X = C$: kadar) dan dibuat garis lurus yang merupakan ekstrapolasi titik-titik kadar lawan serapan baku tersebut.

IV.6.3.2. Penetapan kadar seng³⁶.

1. Dilarutan Zn yang dipipet dengan seksama sebanyak 10,0 ml dari serosa setelah perlakuan, diencerkan dengan akuabides hingga 50,0 ml, diambil 10,0 ml diencerkan lagi dengan akuabides hingga 20,0 ml, dimasukkan ke dalam corong pisah, lakukan ekstraksi seperti pada

IV.6.3.1. angka 2 hingga 6. Gunakan 20,0 ml akuabides sebagai blanko.

2. Absorbansi (serapan), A , yang diperoleh dari pembacaan kemudian diplotkan ke dalam persamaan garis lurus dan dihitung besarnya kadar seng.

IV.6.4. Penetapan pH

Diambil larutan uji, kemudian diukur pH menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi. Diuji pula pH vitamin C dengan kadar sama dengan perlakuan dan larutan ringer sebagai pelarut.

1. Dinyalakan dan biarkan alat mengalami penyesuaian
2. Disiapkan larutan buffer dalam gelas piala untuk kalibrasi pH meter.
3. Jika alat tidak dilengkapi tombol pengendali suhu yang tidak otomatis, dibaca suhu larutan dan disetel pengendali suhu; jika pengendali suhu otomatis, pengindera suhu dibenamkan ke dalam larutan buffer standar pertama.
4. Dichelupkan gabungan elektroda dan jika ada setel saklar selektor alat itu untuk membaca pH.
5. Disesuaikan tombol pengendali "set buffer" sampai pembacaan alat itu cocok dengan pH buffer. Diambil elektroda, dibilas dan dicocokkan lagi pHnya (kalibrasi).

6. Jika kalibrasi telah memuaskan, elektroda dibilas dengan akuabides dan dimasukkan ke dalam larutan uji. Dibaca pH larutan uji itu.
7. Diambil elektroda dan dibilas dengan akuabides, bila tidak dipakai usahakan elektroda selalu tercelup dalam akuabides³⁷.

IV.7. Analisa data

1. Waktu optimal untuk absorpsi seng ditentukan dengan menggunakan waktu dimana kadar seng paling tinggi (puncak).
2. Rata-rata kadar seng yang diabsorpsi dihitung prosentasenya terhadap kadar seng yang diberikan.
3. Normalitas distribusi/varians kadar seng dan pH yang diperoleh diuji dengan uji Kolmogorov-Smirnov.
4. Rata-rata kadar seng yang diabsorpsi pada masing-masing kelompok diuji perbedaannya dengan uji Anova satu jalan (one way Anova). Untuk menentukan kelompok mana yang absorpsinya optimal digunakan uji Least Significant Different (LSD)^{39,40}.
5. Hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan gambar
6. Analisa dihitung menggunakan paket statistik SPSS-PC dengan batas kemaknaan 95% ($P=0,05$).

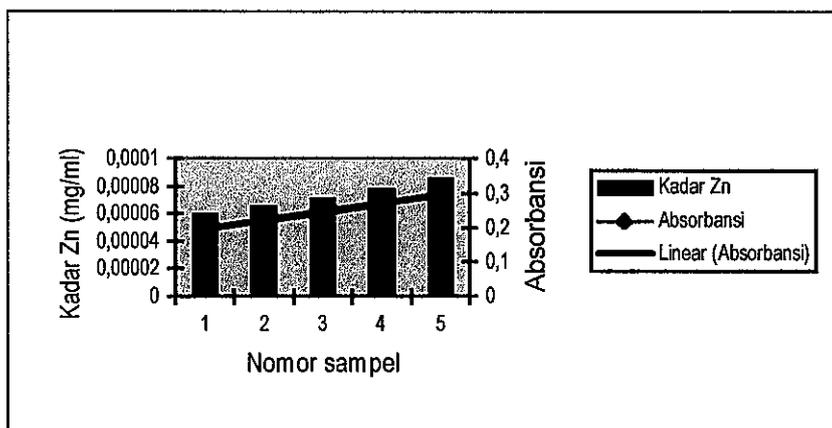
BAB V

HASIL DAN ANALISA HASIL PENELITIAN

V.1. Hasil penelitian

V.1.1. Pre eksperimen

Dari hasil penelitian pendahuluan diperoleh bahwa panjang gelombang maksimal Zn-dithizonat terletak pada 535 dan 620 nm dengan waktu pembacaan ("operating time") tidak lebih dari 15 menit setelah terjadi reaksi. Absorptivitas rata-rata Zn-dithizonat = $3.404 \times 10^3 (\pm 68,69)$

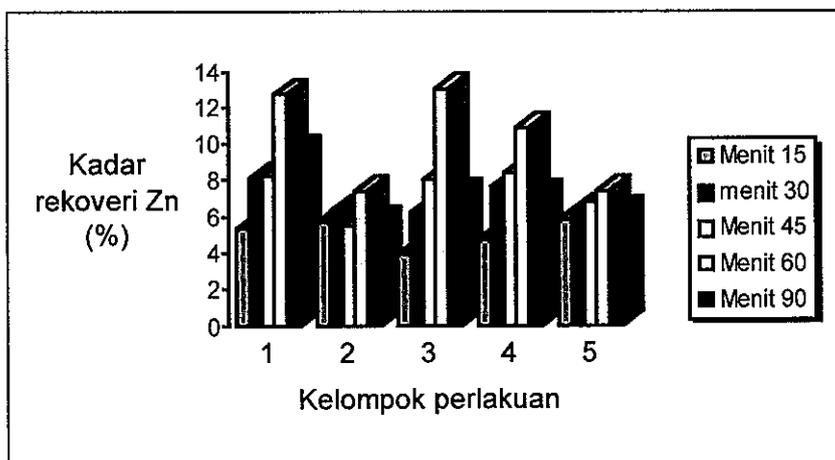


Gambar 1 : Grafik hubungan kadar Zn baku terhadap absorbansi pada panjang gelombang 535 nm

(tabel 1). Persamaan garis lurus $Y = 3.679,23 X - 0,0194$ (lampiran 1) ditunjukkan sebagai garis linear absorbansi (gambar 1) dan uji normalitas distribusi (Kolmogorov-Smirnov) menunjukkan kurva normal, sedangkan uji hubungan antara kadar dan absorbansi (Pearson) $r_{cal} = 0,993 > r_{tab} =$

0,959 ($P=0,01$, $df 5$) yang berarti ada korelasi signifikan positif kuat antara kadar dengan absorbansi pada level 0,01 (lampiran 2,3)

Dari hasil percobaan pengaruh waktu perlakuan terhadap kadar rekoveri, yaitu kadar Zn yang melewati dinding usus setelah perlakuan dibandingkan dengan kadar Zn yang diberikan untuk uji sebelum perlakuan (tabel 2) menunjukkan adanya peningkatan jumlah Zn yang ditransfer mulai dari menit ke 15, 30, 45 dan 60, tetapi pada menit ke 90 mengalami penurunan berturut-turut adalah 5,09 ($\pm 0,77$); 6,89 ($\pm 0,90$); 7,27 ($\pm 1,24$), 10,28 ($\pm 2,80$) dan 7,17 ($\pm 1,50$) % (lampiran 4).



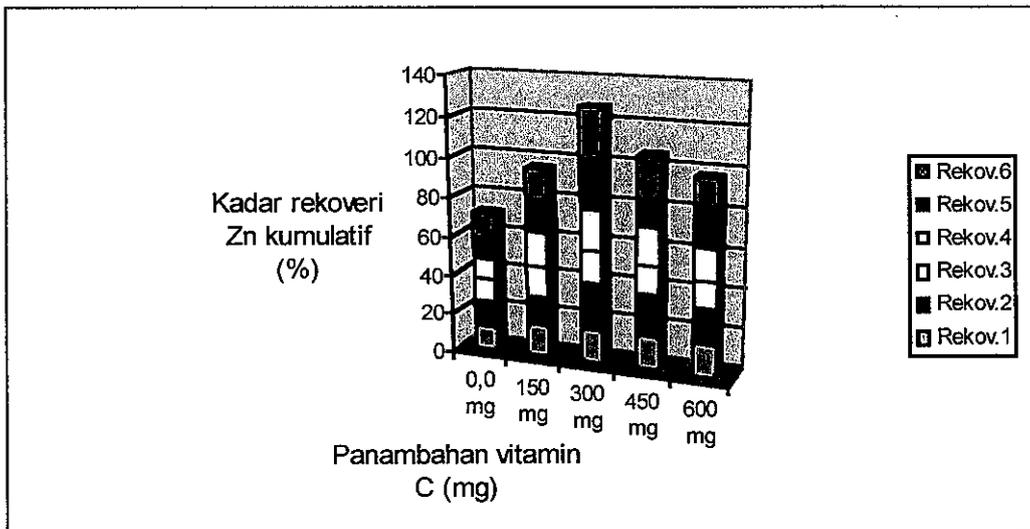
Gambar 2 : Grafik pengaruh waktu perlakuan terhadap Kadar rekoveri Zn

Dengan demikian waktu yang diperlukan agar kadar seng melewati usus mencapai optimal terjadi pada menit ke 60 (gambar 2) setelah perlakuan. Uji normalitas distribusi kadar rekoveri akibat pengaruh waktu perlakuan dinyatakan sebagai normal (lampiran 5).

V.1.2. Eksperimen

Komposisi atau perbandingan kombinasi $ZnSO_4$ +vitamin C berbagai kadar yang digunakan sebagai variabel independen dalam eksperimen sebagaimana tabel 3 (lampiran 6,7).

Untuk mendapatkan jumlah atau banyaknya seng yang ditransfer melewati usus dilakukan percobaan dengan memasukkan larutan seng sejumlah tertentu ke kantong usus normal (bagian mukosa berada di dalam) yaitu modifikasi prosedur Wilson-Wiseman. Banyaknya seng yang berpindah ke sisi seberang (bagian serosa) setelah 60 menit perlakuan diambil, dibaca absorbansi pada 535 nm (tabel 4) dan dihitung kadar rekoverti (tabel 5).



Gambar 3 : Grafik pengaruh penambahan vitamin C terhadap kadar rekoverti Zn

Pada gambar 3 tersebut di atas memperlihatkan bahwa pada penambahan 300 mg vitamin C memberikan kadar rekoveri Zn kumulatif yang paling tinggi.

Dilakukan pula pengukuran pH larutan kombinasi $ZnSO_4$ dengan vitamin C sebelum perlakuan (tabel 6) dan sebagai pembanding dilakukan pengukuran derajat keasaman, pH vitamin C dalam larutan Ringer (tabel 7).

V.2. Analisa hasil penelitian

Penelitian pengaruh vitamin C berbagai kadar terhadap absorpsi seng telah dilakukan. Absorbansi yang diperoleh diplotkan ke dalam persamaan garis lurus kurva baku Zn yaitu $Y = 3679,233 X - 0,0194$, dimana $Y =$ absorbansi dan $X =$ kadar (gambar 1) atau menggunakan rumus Hukum Beer-Lambert, $A = abc$, dimana $A =$ absorbansi, $b = 1$ cm (jarak yang dilalui sinar) dan $a : \text{absorptivitas} = 3.404 \times 10^3$ ml/mg-cm (tabel 1). Untuk mengetahui waktu optimal dilakukan percobaan pengaruh waktu perlakuan terhadap banyaknya (rekoveri) seng, yaitu berasal dari kadar seng yang berpindah ke sisi serosa dibandingkan dengan banyaknya Zn yang diberikan sebelum perlakuan. Uji perbedaan antar perlakuan didapatkan bahwa ada perbedaan bermakna dan perbedaan itu terjadi pada menit ke 60, sedang antar waktu perlakuan lainnya (menit 15, 30, 45 dan 90) tidak berbeda secara signifikan (lampiran 8). dan telah

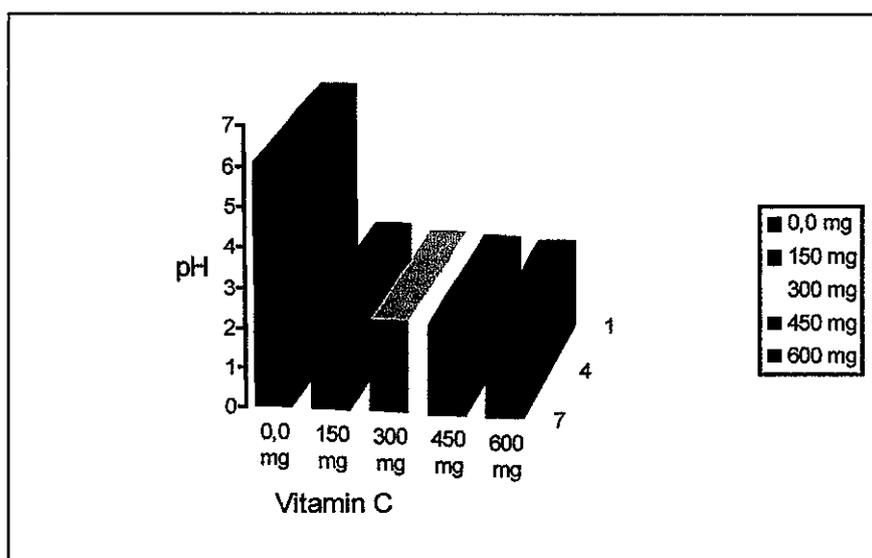
diperoleh waktu optimal rekoveri seng terjadi pada menit ke 60 setelah perlakuan (gambar 2)

Pada percobaan eksperimen yaitu dengan memberikan vitamin C berbagai kadar pada seng yang diukur setelah 60 menit perlakuan (tabel 5) diperoleh kadar rekoveri Zn sebesar $11,82(\pm 0,90)$, $15,91(\pm 1,00)$, $21,15(\pm 3,93)$, $17,57(\pm 3,06)$ dan $16,22(\pm 2,42)$ % (lampiran 9).

Uji statistik Anova satu jalan dengan hipotesa $H_0 : \mu A1 = \mu A2 = \mu A3 = \mu A4 = \mu A5$ diperoleh $F_{\text{cal}} = 10,36 > F_{\text{tab}} = 2,76$ $\{P=0,05; df (4,25)\}$, dengan demikian H_0 ditolak. Hal ini berarti bahwa ada perbedaan secara bermakna pengaruh vitamin C terhadap banyaknya seng yang ditransfer melewati usus. Sedangkan untuk menguji perbedaan antar perlakuan dan untuk mengetahui perlakuan mana yang memberikan hasil lebih baik dilakukan Uji Least Significant Different, $LSD_{t/2\alpha, df 30} = 3,039$, masing – masing perlakuan ternyata diperoleh adanya perbedaan bermakna antara pemberian 150, 300, 450, dan 600 mg vitamin C (perlakuan A2, A3, A4 dan A5) dibandingkan dengan tanpa pemberian sama sekali (perlakuan A1), tidak ada perbedaan bermakna antara perlakuan A2, A4 dan A5 tetapi perlakuan A3 (dengan 300 mg vitamin C) memberikan hasil rekoveri yang lebih baik dibanding keempat perlakuan lainnya dan berbeda secara bermakna (lampiran 10).

Pada uji terhadap perubahan pH akibat penambahan vitamin C berbagai kadar dalam larutan Ringer (gambar 4) diperoleh $6,11(\pm 0,007)$,

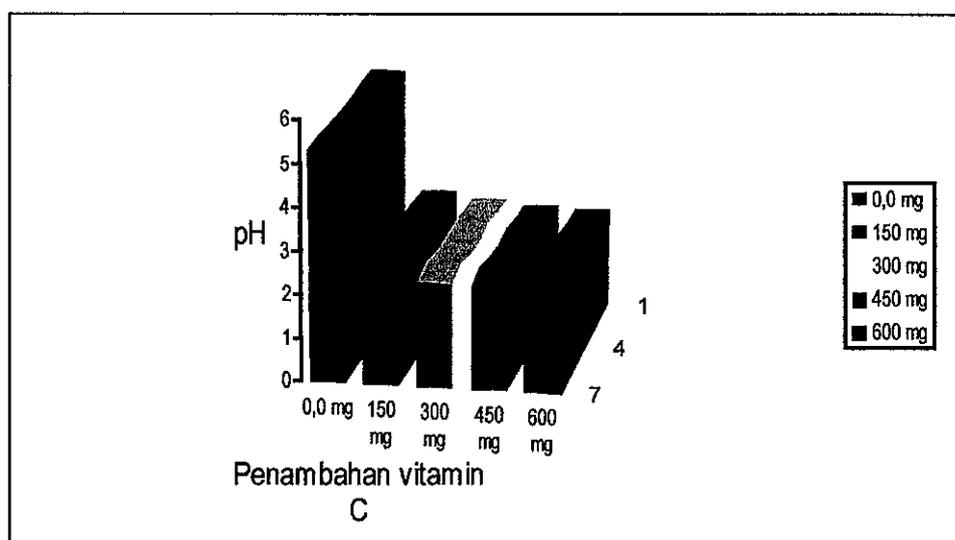
2,49(± 0,005), 2,34(± 0,008), 2,28 (± 0,005) dan 2,22 (± 0,007) (lampiran 11). $F_{cal} = 539054,61 > F_{tab} = 2,69$, { $P=0,05$; $df(4,30)$ }, H_0 ditolak, sedangkan uji LSD $_{0,05 df(4,30)} = 0,006$, hal ini menunjukkan bahwa diantara masing-masing perlakuan mempunyai perbedaan yang signifikan, dengan demikian pada setiap penambahan vitamin C mampu menurunkan pH larutan secara bermakna (lampiran 12).



Gambar 4 : Grafik pH vitamin C dalam larutan Ringer

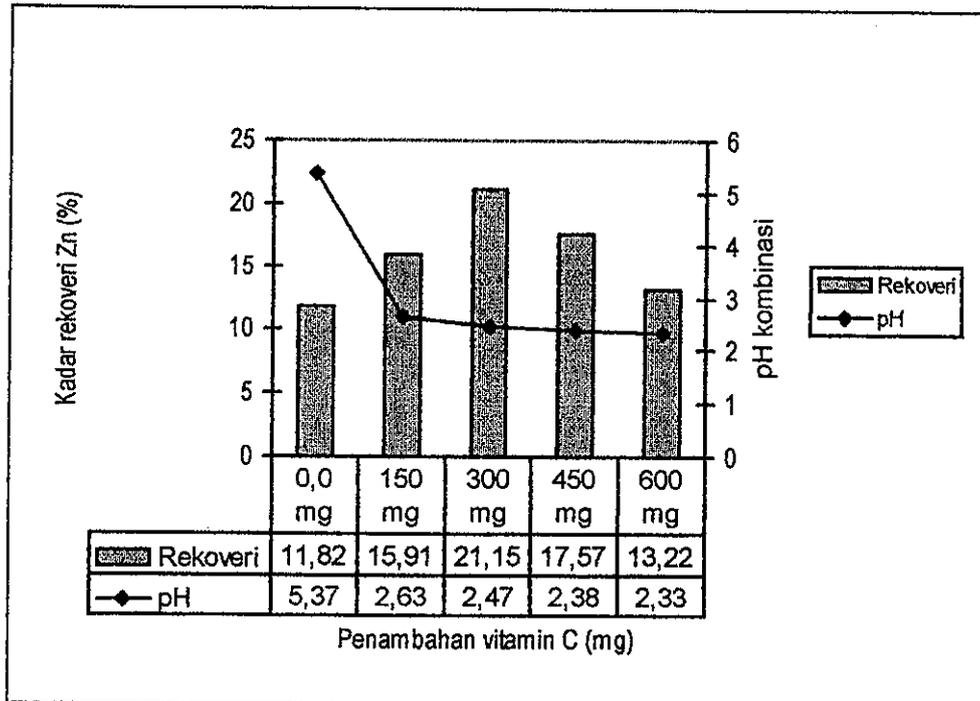
Uji statistik beda pH kombinasi menunjukkan $F_{cal} = 30,0 > F_{tab} = 2,69$ { $P=0,05$ $df(4,30)$ }, hal ini berarti H_0 ditolak, ada perbedaan signifikan penambahan vitamin C terhadap penurunan pH lingkungan. Selanjutnya uji $LSD_{f1/2\alpha(30)}$ diperoleh 0,662, menunjukkan ada perbedaan pH secara bermakna antara penambahan vitamin C (perlakuan A2, A3, A4, dan A5)

dibanding tanpa penambahan (A1), sedang antar penambahan vitamin C sendiri, semakin banyak penambahannya ternyata tidak mempunyai perbedaan cukup bermakna terhadap perubahan penurunan pH larutan (lampiran 13, gambar 5). Rata-rata pH kombinasi adalah $5,37 (\pm 0,051)$, $2,63 (\pm 0,06)$, $2,47 (\pm 0,05)$, $2,38 (\pm 0,05)$ dan $2,33 (\pm 0,04)$ (lampiran 14).



Gambar 5 : Grafik pH kombinasi 220 mg ZnSO₄+vitamin C

Perhitungan statistik untuk menunjukkan normalitas distribusi digunakan uji Kolmogorov-Smirnov satu sampel masing masing hasil percobaan (penentuan kadar rekoverti, pH kombinasi dan pH larutan vitamin C) membuktikan distribusi normal (lampiran 15, 16 dan 17).



Gambar 6 : Grafik pH kombinasi lawan kadar rekoveri Zn

Pada gambar grafik ini terlihat jelas bahwa kadar rekoveri maksimal terjadi pada pH 2,47 yaitu pada formulasi optimal 220 mg ZnSO₄ dan 300 mg vitamin C.

BAB VI

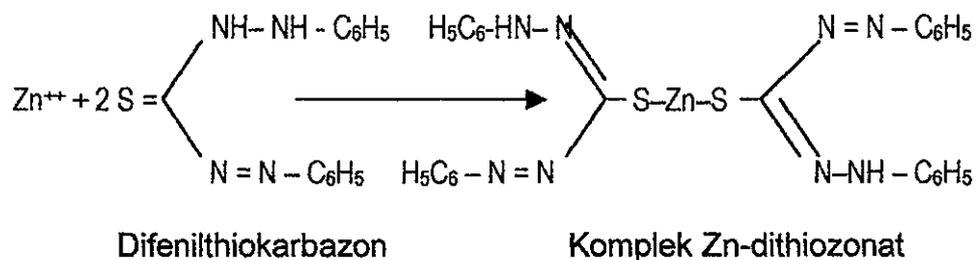
PEMBAHASAN

Metoda yang digunakan untuk penetapan kadar seng menggunakan spektrofotometri metoda Dithizon yang merupakan metoda standar yang direkomendasikan untuk penetapan logam dalam air dan limbah air selain metoda standar lain yaitu spektrofotometri serapan atom. Secara prinsip metoda ini bereaksi dengan dithizon menghasilkan senyawa berwarna, logam-dithizonat, dan mampu diekstraksi ke dalam pelarut organik seperti Karbon tetraklorida (CCl_4). Spektrum serapan maksimum terjadi pada panjang gelombang 535 dan 620 nm³⁶ dan pada panjang gelombang ini seringkali diterapkan sebagai dasar untuk penentuan absorbansinya. Warna dan intensitas yang terbentuk sangat tergantung terhadap kadar, mulai dari biru, biru violet, violet, merah violet hingga merah.

Sebagian besar interferensi dalam reaksi Zn-dithizonat dapat dihilangkan dengan mengatur pH menjadi 4,0 hingga 5,5 menggunakan larutan penyangga (*buffer*) pH asetat dan penambahan natrium thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Meskipun Zn mampu membentuk kompleks lemah thiosulfat yang cenderung memperlambat reaksi secara lambat dan tidak lengkap antara Zn dengan dithizon, tetapi hal ini mampu diatasi dengan melakukan penetapan secara teknik-identik antara analisa sampel dan

standar, disamping itu lama dan kekuatan penggojogan, volume sampel natrium thiosulfat, dithizon dan pH (*buffer*) harus dalam keadaan sama dan konstan.

Beberapa hal lain yang perlu mendapat perhatian diantaranya kemurnian reagen yang harus dijaga dan dibebaskan dari kontaminan atau interferensi



yang dapat mengganggu reaksi dengan melakukan ekstraksi terlebih dahulu menggunakan larutan dithizon, penggunaan natrium asetat hidrat dan akuabides. Larutan natrium sitrat sebagai pembersih alat gelas sebaiknya digunakan untuk menghilangkan beberapa kontaminan yang tertinggal sehingga tidak mengganggu terjadinya reaksi pembentukan senyawa kompleks tersebut dan akan memberikan hasil ulangan lebih baik.

Pada penelitian pre eksperimen, telah dilakukan penentuan kurva persamaan garis lurus dan absorptivitas. Kedua hal ini dapat digunakan untuk ekstrapolasi absorbansi terbaca menjadi kadar atau banyaknya seng yang ada di dalam larutan tersebut. Dari hasil kurva baku dapat diketahui bahwa penetapannya mematuhi Hukum Beer-Lambert⁴¹, sedangkan secara statistik hubungan antara kadar dengan absorbansi

dinyatakan sebagai korelasi bermakna dan sebagaimana kriteria yang diberikan oleh Young⁴⁰ bahwa $\rho \geq 0,80$ ($\rho_{cal} = 0,993$) dikategorikan sebagai hubungan yang sangat kuat.

Pada penentuan waktu sebagai dasar lama perlakuan pada penelitian tahap eksperimen, absorpsi Zn mengalami kenaikan secara bertahap dan mencapai optimal kurang lebih menit ke 60 dengan kadar rekoveri $10,28 (\pm 2,80) \%$, setelah itu mengalami penurunan pada menit ke 90.

Adanya perbedaan kadar di kedua sisi membran memungkinkan terjadinya difusi pasif yang merupakan bagian terbesar dari proses transmembran bagi umumnya obat, sebagaimana hukum Fick^{2,15}, molekul obat berdifusi dari daerah konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah.

$$\delta Q/dt = DAK/h (C_{G1} - C_p)$$

dimana

$\delta Q/dt$: laju difusi

D : koefisien difusi

K : koefisien partisi

A : luas permukaan membran

h : tebal membran

$C_{G1} - C_p$: perbedaan konsentrasi obat dalam mukosa dan serosa.

Berkaitan dengan penelitian ini, parameter yang terkontrol adalah waktu (menit ke-60), koefisien partisi, koefisien difusi dan perbedaan konsentrasi (karena obat yang diberikan sama, $ZnSO_4$, dan konsentrasi tidak mempunyai perbedaan), oleh karena itu faktor lain yang masih mempengaruhi laju absorpsi obat adalah luas permukaan kontak obat dan tebal membran. Hal ini nampak dari data yang menunjukkan adanya deviasi yang cukup tinggi dibanding dengan kadar rekoverynya sendiri. Faktor pengaruh tersebut sangat tergantung dari kondisi usus yang digunakan, untuk itu homogenitasnya perlu mendapat perhatian.

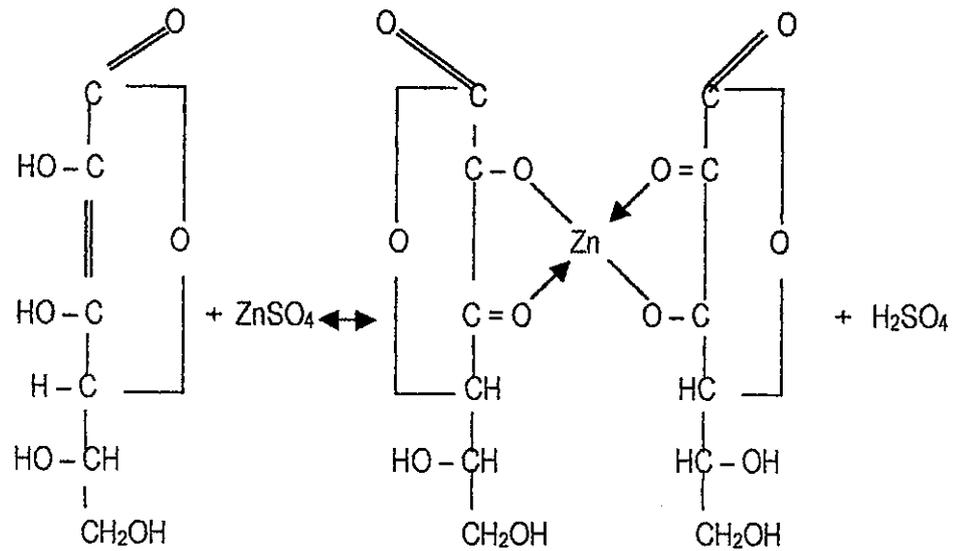
Difusi tersebut akan berakhir pada kesetimbangan pada kedua sisi, tetapi akibat adanya pengaruh vitamin C menyebabkan terjadinya perbedaan pH antara mukosa dengan serosa memungkinkan adanya ketidaksamaan konsentrasi pada kedua sisi terutama pada obat – obat terionisasi.

Adanya perbedaan pH pada satu sisi membran dengan sisi membran lain, menurut hipotesis partisi pH, maka (1) obat (asam lemah dan basa lemah) akan terionisasi pada tingkat yang berbeda di masing – masing membran; (2) konsentrasi total obat (terionisasi dan tak terionisasi) pada setiap sisi membran tidak sama; dan (3) kompartemen dimana obat lebih banyak terionisasi akan mengandung konsentrasi total obat lebih besar¹⁵. Berdasarkan hipotesis ini $ZnSO_4$, yang bersifat asam lemah (pH = 4,5) akan lebih cepat diabsorpsi pada pH yang lebih rendah,

semakin pH lebih rendah akan diabsorpsi lebih banyak. Hal ini sejalan dengan persamaan *Henderson-Hasselbalch* yaitu $pH = \log C_i/C_u + pKa$, konsentrasi ionik asam lemah akan menurun dengan penurunan pH larutan berair, dengan kata lain penurunan pH akan berdampak pada kenaikan absorpsi seng^{2,15}.

Pada kenyataannya penambahan vitamin C 150, 300, 450 dan 600 mg menunjukkan penurunan pH, tetapi secara statistik tidak berbeda signifikan, sehingga secara teoritis tidak ada perbedaan nyata di antara penambahan vitamin C berbagai kadar tersebut terhadap kenaikan kadar rekoveri seng atau jumlah seng yang ditransfer. Di sisi lain kalau dilihat dari hasil perhitungan kadar rekoveri didapatkan hasil yang cukup berarti pada penambahan 300 mg vitamin C ($21,15 \pm 3,93 \%$) dibanding penambahan yang lain dan absorpsi maksimal ini terjadi pada pH 2,47. Pada penambahan vitamin C lebih dari 300 mg terjadi penurunan absorpsi. Hal ini sudah tidak sejalan lagi dengan hukum *Henderson-Hasselbalch*, mungkin ada mekanisme yang lain diluar pengaruh pH.

Adanya dugaan kemungkinan melalui mekanisme pembentukan kompleks sebagaimana reaksi di bawah ini yang menghasilkan kompleks dan asam sulfat nampaknya kurang beralasan karena dari pembacaan pH kombinasi dan vitamin C 300 mg menunjukkan 2,48 dan 2,33 sedangkan asam sulfat (asam kuat) sendiri mempunyai $pH = \pm 1$.



Vitamin C

" Komplek Zn-askorbat"

Di samping itu secara kimiawi sifat elektronegatifitas (reaktifitas) ion SO_4^- lebih reaktif dibanding ion dehidro askorbat, sedangkan bila dilihat dari aspek reduktor yang dimiliki oleh ZnSO_4 yang bersifat amfoter memiliki energi potensial, δE , sangat kecil sehingga kemampuan bereaksi dengan oksidator kuat (vitamin C) juga kecil, hal ini sangat berbeda bila digunakan serbuk seng (Zn).

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

VII.1. Simpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Waktu optimal untuk absorpsi seng terjadi pada menit ke 60.
2. Prosentase seng yang mampu diserap oleh usus tanpa penambahan vitamin C sebesar 10,28 ($\pm 2,80$) % dari jumlah yang diberikan.
3. Penambahan vitamin C berpengaruh terhadap kenaikan absorpsi seng secara bermakna. Absorpsi paling optimal terjadi pada penambahan vitamin C sebanyak 300 mg atau pada komposisi (220,43 mg ZnSO_4 + 300,46 mg vitamin C) dan terjadi pada pH 2,47 yaitu sebesar 21,15 ($\pm 3,93$) %. Dengan demikian terjadi peningkatan absorpsi kurang lebih sebesar 178,93 % dibanding tanpa penambahan vitamin C.

VII.2. Saran

1. Perlu diadakan penelitian lanjut tentang mekanisme (kimia, fisika, absorpsi) berkaitan dengan adanya anomali pada penambahan vitamin C lebih tinggi dari 300 mg.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjut tentang pengaruh pemberian kombinasi 220 mg ZnSO_4 dan 300 mg vitamin C secara in vivo.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gan S, Setiabudy R, Syamsudin U, dkk, Farmakologi dan terapi, 4th ed., Jakarta : Penerbit Gaya Baru, 1995: hal. 1-5, 728-735.
2. Ritschel WA, Handbook of basic pharmaceuticals, 1st ed. Illinois : Drug Intelligence Pub., 1976: pp. 31-34, 48-55.
3. Linder MC, Nutrisi dan metabolisme mikromineral. Dalam (Linder MC ed.), Biokimia nutrisi dan metabolisme, Jakarta: UI Press, 1992: hal. 279-284.
4. Sandstead HH, Evans GW, Seng. In (Olson RE, Broquist HP, Chilchester CO, et al eds.), Pengetahuan gizi mutakhir: Mineral, Jakarta: Penerbit Gramedia, 1988: hal. 101-105.
5. Reynolds JEF, Martindale: The extra pharmacopoeia, 28th ed., London: The Pharmaceutical Press, 1982: pp. 945-946
6. Anonim, IIMS Product Focus, Volume 2, 1992: p. 6.
7. Blazek I and Mathe G, Zinc and immunity. Dissertation, Universite Paris-Sud, 1984: pp.187-193.
8. Sofro ASM, Protein, vitamin dan bahan ikutan pangan, PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta, 1992: hal. 182-186.
9. Mudjiharto T, Pengaruh vitamin C terhadap absorpsi metampiron pada tikus putih secara in situ. Skripsi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 1993.

10. Aminah S dan Nusratini, Pengaruh nikotinamida terhadap kelarutan dan absorpsi in vitro sulfametoksazol. Dalam (Marchaban, Sugiyanto, Supardi dan Sumantri, ed.) Prosiding kongres ilmiah XI ISFI, Semarang, 1996 : hal. 424-428.
11. Anonim, MIIMS Indonesia, 27, 1998 : pp.300-322
12. Alnwick D, Davidson F, Ferguson E, et al, Consensus statement on zinc nutrition and public health in developing countries, Brisbane, 1993: pp.1-12.
13. Lodish H, Baltimore D, Berg A, et al., Molecular cell biology, 3rd ed., New York: Scientific American Book, Inc. 1995: pp. 635-636.
14. Mutschler E, Dinamika obat. Dalam (Widianto MB, Ranti AS dan Padmawinata K, ed.), Bandung, Penerbit ITB, 1991: hal. 9-12.
15. Shargel L and Yu ABC, Biofarmasetika dan farmakokinetika terapan. Dalam (Fasich dan Sjamsiah S, ed.), Surabaya, Airlangga University Press, 1985: hal 86-93.
16. Mudjiharto T, Faktor-faktor yang mempengaruhi absorpsi obat dalam saluran cerna, Varia farmasi, 46, 1983 17-21.
17. Stockley IH, Drug interactions, 3rd ed., Nottingham, Blackwell Science, 1994: pp. 1-6.
18. Dufful S, Drug and food clinically significant interaction, Med. Progress, 24, 1997: 33-37.

19. Valberg LS, Flanagan PR, Chamberlain MJ, Effect of iron, tin and copper on zinc absorption in humans, *Am.J.Clin.Nutr.* 40, 1984: 536-541.
20. Sanberg AS, Brune M, Carlsson NG, et al, The effect of various inositol phosphates on iron and zinc absorption in human. In (Schlemmer U, ed.), *Proceeding Bioavailability'93: Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability, part 2, Ettlingen, 1993: pp.53-62.*
21. Astuti M, Kasoka S and Goto S, Iron, copper and zinc balance of moderately anemic rats fed with soybean tempe diets. In (Schlemmer U, ed.), *Proceeding Bioavailability'93: Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability, part 2, Ettlingen, 1993: pp.73-77.*
22. Whitney EN, Cataldo, CB and Rolfes SR, *Understanding normal and clinical nutrition, 2nd ed, New York: West Pub. Comp., pp.420-422.*
23. Solomons NW and Shrimpton R, Zinc. In (Warren KS and Mahmoud AAF eds.) *Tropical and geographical medicine, New York: Mc. Graw Hill Pub., 1984 :pp.1059-1061.*
24. Solomon NW, *Biological availability of zinc in humans, Am. Clin. Nutr.* 35, 1982: pp. 1048-1057.
25. Wu FY and Wu CW, *Zn in DNA replication and transcription, New York, 1987: pp. 251-269.*

26. Roedjito D, Keterkaitan kandungan seng tanah dan air dengan status Zn masyarakat, Laporan Riset Unggulan Terpadu, Institut Pertanian Bogor, 1994.
27. Hidayat A, Ali M, Kosen dkk, Studi suplementasi dengan tablet Zinco pada ibu hamil, efeknya terhadap kemajuan dan hasil kehamilan di Propinsi Nusa Tenggara Timur. Laporan hasil penelitian Universitas Brawijaya, Malang, 1997.
28. Atmaja DS, Japaries W dan Siswanto E. Penelitian status zink dengan tes kecap Smith pada masyarakat RW 04 Manggarai Jakarta. MKI 38, 1998: hal. 611-616.
29. Riyadi H. Hubungan serum seng dengan hambatan pertumbuhan pada anak sekolah dasar. Media Gizi dan Keluarga 16, 1992: hal. 9-16.
30. Satoto, Subagyo HW, Siswanti dkk, Hubungan antara kekurangan seng dengan tumbuh kembang dan kejadian infeksi di kalangan anak balita. Laporan Riset Unggulan Terpadu (RUT) II, Universitas Diponegoro, Semarang, 1996.
31. Solomon NW, Competitive mineral-mineral interaction in the intestine implication for zinc absorption in humans. Symposium, Guatemala, 1982..
32. Griffin JB, D'arcy PF and Spers CJ, A manual of adverse drug interactions, 4th ed., London, Butterworth & Co ltd. 1988: pp. 18-29.

33. Hadi S, Metodologi research, Jilid 4, Yogyakarta: Andi Offset, , 1998: hal. 458-462.
34. Hadi S, Rancangan dasar dan analisa dalam eksperimen kedokteran, Yogyakarta: Yayasan Penerbit Fakultas Psikologi, 1976: hal. 24-30, 48-51.
35. Pratiknya AW, Dasar-dasar metodologi penelitian kedokteran dan kesehatan, Jakarta, PT Raja Grafindo Persada, 1993: hal. 149-150.
36. Greenberg AE, Conors JJ and Jenkins D, Standard method for the examination of water and wastewater, 15th ed. Washington: American Public Health Assoc. 1981: pp. 242-244.
37. Vogel AI, In (Bassett J, Denney RC, Jeffery GH et al ed.), Vogel's Textbook of quantitative in organic analysis, 4th ed., London: ELBS, 1978: pp.683-691, 700-701.
38. Ritchel WA, Laboratory manual of biopharmaceutics and pharmacokinetics, Illinois: Drug Intelligence Pub., Inc, 1974: pp.115-123.
39. Saleh S, Statistik induktip, edisi ke 2, Yogyakarta, Penerbit Liberty, 1988,: hal. 207-250.
40. Djarwanto, Mengenal beberapa uji statistik dalam penelitian, cetakan pertam, Yogyakarta, Penerbit Liberty, 1996: hal. 138-174.

41. Sastrohamidjojo H dan Nugrahati S, Spektroskopi ultraviolet dan terlihat, Laboratorium Analisa Kimia/Fisika Pusat UGM, Yogyakarta, 1985: hal. 10-12.