

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Ruang lingkup penelitian

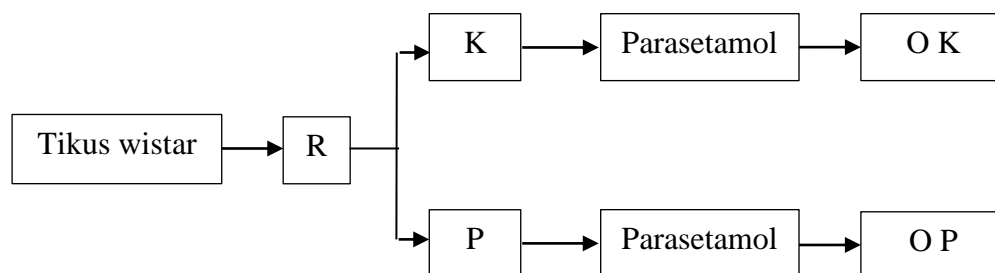
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Ilmu Farmakologi dan Terapi

#### 3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk pemeliharaan dan Laboratorium Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada untuk pemeriksaan profil farmakokinetik. Penelitian dilakukan selama bulan Maret sampai dengan bulan Mei 2016.

#### 3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini berjenis *true experimental* dengan *post test only control group design*.



**Gambar 4.** Rancangan Penelitian

Keterangan:

R : Randomisasi

K : Kontrol (diet standar)

P : Kelompok perlakuan yang diberi minyak jelantah selama 56 hari

O K : Profil farmakokinetik parasetamol darah parameter  $K_a$ ,  $C_{maks}$ ,  $t_{maks}$ ,  $V_d$ ,  $Cl$ ,  $K_{el}$ ,  $t_{1/2e}$ , dan AUC kelompok K

O P : Profil farmakokinetik parasetamol darah parameter  $K_a$ ,  $C_{maks}$ ,  $t_{maks}$ ,  $V_d$ ,  $Cl$ ,  $K_{el}$ ,  $t_{1/2e}$ , dan AUC kelompok P

### 3.4 Populasi dan sampel

#### 3.4.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar.

#### 3.4.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus galur wistar jantan yang terandomisasi yang dikandangkan secara individual dengan siklus pencahayaan 12 jam, suhu ruangan, mendapat makan dan minum *ad libitum*. Tikus galur wistar jantan dipilih karena tidak terdapat hormon estrogen yang mungkin dapat mempengaruhi hasil penelitian. Sampel yang digunakan memenuhi kriteria sebagai berikut:

#### 3.4.2.1 Kriteria inklusi

- Tikus wistar jantan
- Berat badan tikus normal (150-220 gram)
- Usia 12 minggu sebelum adaptasi
- Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomis

#### 3.4.2.2 Kriteria eksklusi

- Tikus mengalami penurunan berat badan (<100 gram)
- Tikus tidak bergerak secara aktif
- Tikus mengalami perubahan perilaku (tidak mau makan, lemas)
- Tikus mati selama masa penelitian

#### 3.4.3 Cara sampling

Sampel penelitian diperoleh secara *simple random sampling*.

#### 3.4.4 Besar sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO yaitu minimal 5 ekor tiap kelompok<sup>39</sup>. Penelitian ini menggunakan 7 ekor tikus wistar jantan untuk setiap kelompok.

Pada penelitian ini terdapat satu kelompok kontrol dan satu kelompok perlakuan, sehingga berdasarkan kriteria tersebut total sampel pada penelitian ini adalah 14 ekor tikus wistar jantan.

### 3.5 Variable penelitian

#### 3.5.1 Variabel bebas

- 1) Minyak jelantah

### 3.5.2 Variabel terikat

- 1) Profil farmakokinetik parasetamol pada darah

### 3.6 Definisi operasional

**Tabel 2.** Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1	Diet standar	Diet standar yang digunakan adalah pellet jenis BR2 <i>ad libitum</i> 20 gram dan air minum yang diberikan setiap hari	Gram	Nominal
2	Diet minyak jelantah	Minyak goreng yang digunakan adalah minyak goreng curah jenis kelapa sawit. Proses pemanasan dimulai dengan memasukkan 2500 mL minyak goreng segar ke dalam ketel untuk menggoreng 1 kg kentang (diperoleh dari Desa Kopeng, Kecamatan Getasan, Kabupaten Semarang) yang telah dikupas dengan suhu 180°C selama 10 menit. Kemudian didiamkan pada suhu ruangan selama lima jam dan diulang sampai pemanasan ke-5. Minyak yang digunakan untuk pengulangan adalah minyak yang sama. Setelah pemanasan ke-5, minyak didinginkan kemudian dicampur dengan pellet BR2 dengan perbandingan berat pellet dengan minyak adalah 100:15. Kemudian hasil campuran tersebut dikeringkan dengan dibiarkan terpapar udara <sup>40</sup> . Pellet hasil campuran yang telah kering kemudian diberikan <i>ad libitum</i> pada kelompok perlakuan P dengan takaran 20 gram/tikus/hari pada pagi hari. Setiap pagi hari yang berikutnya dilakukan pengukuran sisa pellet untuk mengetahui banyaknya pellet yang dikonsumsi tikus.	Gram	Nominal
3	$K_a$	Menggambarkan kecepatan absorpsi, yaitu masuknya obat ke dalam sirkulasi sistemik dari absorpsinya. Didapatkan dengan turunan rumus dari kurva kadar parasetamol dalam darah pada waktu tertentu menggunakan metode Spektrofotometer UV	/menit	Rasio

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
4	$C_{maks}$	Konsentrasi obat maksimum dalam plasma setelah pemberian secara oral. Didapatkan dengan turunan rumus dari kurva kadar parasetamol dalam darah pada waktu tertentu menggunakan metode Spektrofotometer UV	$\mu\text{g/mL}$	Rasio
5	$t_{maks}$	Waktu yang diperlukan untuk mencapai konsentrasi obat maksimum setelah pemberian obat. Didapatkan dengan turunan rumus dari kurva kadar parasetamol dalam darah pada waktu tertentu menggunakan metode Spektrofotometer UV	menit	Rasio
6	Vd	Volume yang didapatkan pada saat obat didistribusikan. Didapatkan dengan turunan rumus dari kurva kadar parasetamol dalam darah pada waktu tertentu menggunakan metode Spektrofotometer UV	mL	Rasio
7	Cl	Merupakan parameter primer yang dapat menjelaskan kinetika eliminasi dari suatu obat. Didapatkan dengan turunan rumus dari kurva kadar parasetamol dalam darah pada waktu tertentu menggunakan metode Spektrofotometer UV	mL/menit	Rasio
8	$K_{el}$	Menggambarkan kecepatan eliminasi, yaitu keluarnya obat dari sirkulasi sistemik. Didapatkan dengan turunan rumus dari kurva kadar parasetamol dalam darah pada waktu tertentu menggunakan metode Spektrofotometer UV	/menit	Rasio
9	$t_{1/2e}$	Waktu dimana konsentrasi obat dalam darah (plasma) menurun hingga separuh dari nilai seharusnya. Didapatkan dengan turunan rumus dari kurva kadar parasetamol dalam darah pada waktu tertentu menggunakan metode Spektrofotometer UV	menit	Rasio
10	AUC	Menggambarkan naik turunnya kadar plasma sebagai fungsi dari waktu. Didapatkan dengan turunan rumus dari kurva kadar parasetamol dalam darah pada waktu tertentu menggunakan metode Spektrofotometer UV	$\mu\text{g.menit/mL}$	Rasio

### **3.7 Cara pengumpulan data**

#### 3.7.1 Bahan

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Pellet BR2
- 3) Minyak goreng curah
- 4) Kentang
- 5) Etil asetat
- 6) Metanol
- 7) Baku pembanding parasetamol
- 8) Parasetamol generik
- 9) Aquades
- 10) CMC 0,1%
- 11) *Tricloroasetat acid* (TCA) 5%

#### 3.7.2 Alat

- 1) Gelas laboratorium
- 2) Timbangan analitik
- 3) Kandang hewan uji
- 4) Pipa
- 5) Kasa
- 6) Spektrofotometer UV
- 7) Sentrifuge
- 8) Mikropipet

- 9) Tabung hematokrit
- 10) Tabung darah beserta koagulan EDTA 3mL
- 11) *Vortex mixer*
- 12) Oven
- 13) Kompor
- 14) Termometer
- 15) Ketel

### 3.7.3 Jenis data

Profil farmakokinetik parasetamol pada darah setelah pemberian diet minyak goreng pemanasan berulang merupakan data primer.

### 3.7.4 Cara kerja

- 1) Pembuatan diet minyak jelantah

Minyak goreng yang digunakan adalah minyak goreng curah. Proses pemanasan dimulai dengan memasukkan 2500 mL minyak goreng segar ke dalam ketel untuk menggoreng 1 kg kentang (diperoleh dari Desa Kopeng, Kecamatan Getasan, Kabupaten Semarang) yang telah dikupas dengan suhu 180°C selama 10 menit. Kemudian didiamkan pada suhu ruangan selama lima jam dan diulang sampai pemanasan ke-5. Minyak yang digunakan untuk pengulangan adalah minyak yang sama. Setelah pemanasan ke-5, minyak didinginkan kemudian dicampur dengan pallet BR2 dengan perbandingan berat pallet dengan minyak adalah 100:15. Kemudian hasil campuran tersebut dikeringkan<sup>40</sup>. Pellet hasil campuran yang telah kering kemudian diberikan *ad libitum* pada kelompok perlakuan P dengan takaran 20 gram/tikus/hari pada pagi hari. Setiap pagi hari

yang berikutnya dilakukan pengukuran sisa pallet untuk mengetahui banyaknya pallet yang dikonsumsi tikus.

2) Pembuatan sediaan parasetamol

Ditimbang CMC sebesar 0,1 gram kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades, maka diperoleh larutan CMC 0,1%. Kemudian ditimbang 1 gram parasetamol bubuk dan ditambahkan larutan CMC 0,1% hingga 100 mL. Dari larutan parasetamol tersebut dilakukan penyetaraan terhadap dosis terapi parasetamol terhadap tikus wistar<sup>41,42</sup>, yaitu 12,5 mg/200gBB. Sehingga diperoleh dosis 1,25 mL/200gBB.

3) Penetapan panjang gelombang maksimum parasetamol

Digunakan larutan baku parasetamol dengan kadar 60 ppm dan diukur resapannya pada panjang gelombang 200 nm sampai 300 nm.

4) Pembuatan kurva baku parasetamol

Ditimbang baku pembanding parasetamol sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan metanol 15 mL dalam gelas beaker, larutan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL kemudian ditambahkan akuades hingga 100 mL dan diperoleh larutan induk baku parasetamol dengan kadar 10 mg/100 mL atau setara dengan 100 ppm. Dari larutan induk tersebut dibuat variasi konsentrasi sebesar 7, 14, 20, 40, 60 dan 100 ppm.

5) Linearitas dan rentang

Dihitung Persamaan regresi linear parasetamol menggunakan model<sup>14</sup>:  
 $y=bx+a$ .



6) Penetapan jadwal pengambilan cuplikan

Dua ekor tikus jantan dipuasakan selama 18 jam kemudian diberi larutan parasetamol dosis tunggal 12,5 mg/200gBB secara oral (konversi dari dosis parasetamol dewasa dengan tabel konversi perhitungan dosis antar jenis hewan, Laurence dan Bacharach)<sup>41,42</sup>. Cuplikan darah diambil pada menit ke-3, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300 dan 360 melalui vena retroorbita. Cuplikan sampel darah tiap waktu diproses sesuai dengan prosedur penetapan kadar parasetamol dalam darah yang digunakan pada penelitian ini.

7) Perlakuan terhadap hewan coba

Seluruh hewan coba dikandangkan secara individual di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Sebelum perlakuan, tikus wistar diadaptasikan selama 7 hari dengan diberi diet dan minum standar yang sama setiap harinya secara *ad libitum*.

Pada hari ke-8, tikus wistar dibagi secara acak ke dalam 2 kelompok:

K : tikus wistar mendapat diet standar *ad libitum*

P : tikus wistar mendapat diet minyak jelantah selama 56 hari

Setelah 56 hari, hewan uji dipuasakan selama 18 jam, kemudian diberikan parasetamol tunggal secara oral sebanyak 12,5 mg/200gBB. Kemudian tikus ditempatkan ke dalam wadah khusus untuk diambil sampel darahnya. Pengambilan sampel darah dilakukan dari vena retroorbita tikus pada menit ke-3, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300 dan 360 masing-masing sebanyak 0,5 mL yang ditampung di dalam tabung berisi EDTA.

### 3.7.5 Pengambilan data

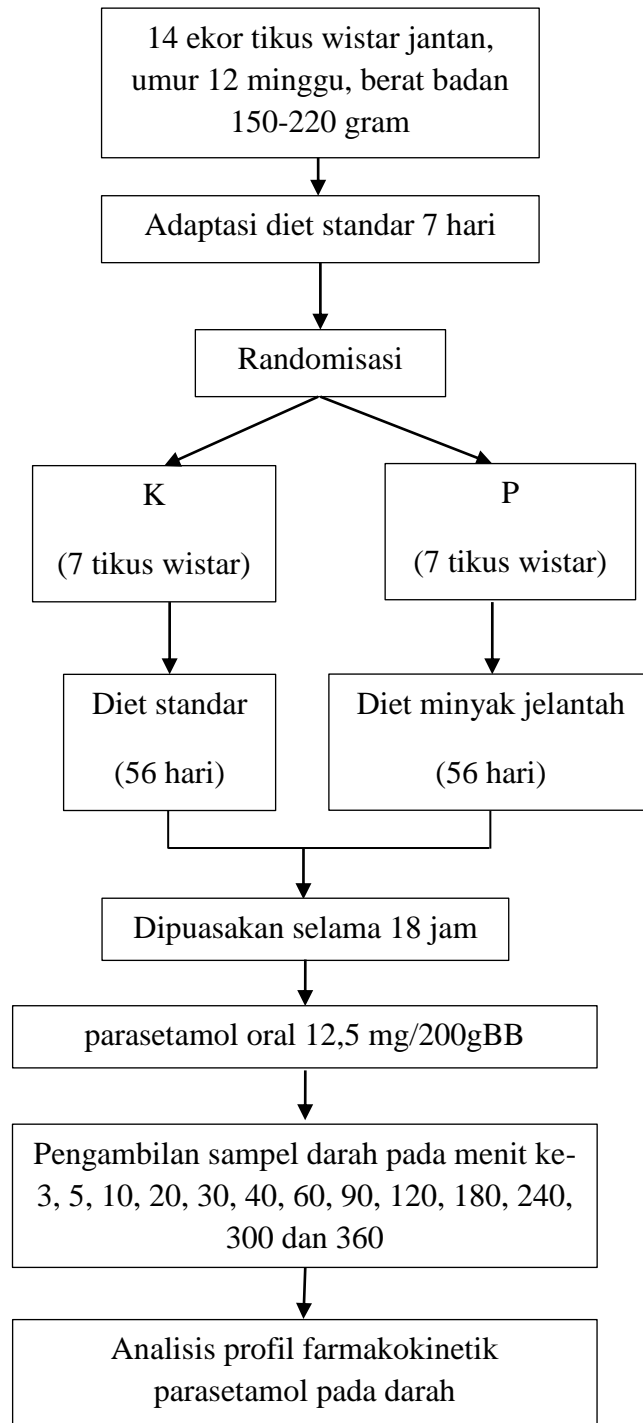
#### 1) Penetapan kadar parasetamol dalam darah metode Rusdiana *et al.*<sup>43</sup>

Darah sebanyak 0,5 mL yang ditampung di dalam tabung berisi EDTA yang telah didapatkan pada tiap waktu pengambilan, ditambahkan 1 mL TCA 5%, disentrifugasi selama 5 menit kecepatan 2500 rpm, diambil beningan atau plasmanya. Plasma ditambahkan dengan 2 mL etil asetat kemudian divortex, bagian beningannya diambil, diuapkan etil asetatnya sampai diperoleh residu parasetamol. Residu dilarutkan kembali dengan 2 mL metanol, diukur absorbansi larutan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV pada panjang gelombang tertentu. Dari data absorbansi, dihitung kadar parasetamol pada tiap cuplikan waktu menggunakan persamaan regresi linear kurva baku parasetamol.

#### 2) Pembuatan profil kadar parasetamol dalam darah

Berdasarkan data darah yang didapat dari setiap waktu, dapat dibuat suatu kurva Ln konsentrasi plasma ( $C_p$ ) terhadap waktu ( $t$ ). Ln konsentrasi plasma sebagai sumbu y dan waktu sebagai sumbu x. Dari kurva tersebut dapat ditentukan profil kadar parasetamol dalam darah<sup>14</sup>.

### 3.8 Alur penelitian



**Gambar 5.** Alur penelitian

### **3.9 Analisis data**

Analisis data diolah dengan program komputer. Normalitas distribusi data diuji dengan uji *Saphiro-Wilk*. Kesamaan varians data diuji dengan uji varians (*Levene's test*). Jika syarat uji parametrik terpenuhi, uji perbedaan pengaruh dari masing-masing kelompok perlakuan dianalisis menggunakan uji t tidak berpasangan. Jika syarat uji parametrik tidak terpenuhi, dilakukan transformasi data. Apabila syarat uji parametrik masih tidak terpenuhi, maka dilakukan uji non parametrik *Mann Whitney*.

### **3.10 Etika penelitian**

Sebelum penelitian dilakukan protokol penelitian dimintakan persetujuan Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang/RSUP Dr. Kariadi Semarang untuk seluruh hewan coba.