

Optimalisasi penggunaan hewan uji tikus (*Rattus norvegicus*) dalam uji *in vitro* absorpsi obat per oral menggunakan metode usus terbalikNatalijah¹¹Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta 55281 Natalijah74@ugm.ac.id

Submisi: 14 September 2020; Penerimaan: 26 Oktober 2020

ABSTRAK

Pengembangan studi biofarmasetika banyak dilakukan untuk dapat mempelajari proses biofarmasetika. Namun, penggunaan jumlah hewan uji yang berlebihan masih belum bisa terhindarkan untuk mencapai suatu nilai validitas yang baik. Salah satu proses biofarmasetika utama yang menjadi fokus studi adalah absorpsi obat secara per oral melalui saluran gastro-intestinal karena model penghantaran ini yang paling banyak digunakan dalam terapi menggunakan produk farmasetik. Metode uji absorpsi per oral yang telah dikembangkan dan diaplikasikan adalah metode usus terbalik. Pada protokol konvensional, hanya ruas usus sepanjang 20 cm per hewan uji tikus yang digunakan, sedangkan intestin memiliki panjang hingga 80-100 cm. Pada studi ini dilakukan analisis berdasar hasil percobaan transport asam salisilat pada pH 7,5 untuk mengetahui validitas penggunaan segmen usus pada ruas 30-50 cm setelah pirolus bila dibandingkan dengan segmen yang digunakan secara konvensional. Diperoleh hasil bahwa kedua segmen memberikan nilai jumlah asam salisilat terakumulasi yang tidak berbeda signifikan ($p=0,442$), oleh karena itu kami menganjurkan ekstensi penggunaan usus tikus untuk mengurangi jumlah hewan uji yang digunakan dalam percobaan.

Kata kunci : biofarmasetika; absorpsi obat; metode usus terbalik

Pendahuluan

Berbagai studi biofarmasetika dikembangkan untuk dapat mempelajari proses biofarmasetika secara valid dan efisien. Proses biofarmasetika merupakan proses penghantaran obat yang mempengaruhi ketersediaan hayatinya di dalam sirkulasi sistemik [Siddiqui MR, 2017]. Salah satu proses biofarmasetika utama yang menjadi fokus studi adalah absorpsi obat secara per oral melalui saluran gastro-intestinal karena model penghantaran ini yang paling banyak digunakan dalam terapi menggunakan produk farmasetik [Homayun B, 2019]. Metode uji absorpsi per oral yang telah dikembangkan dan diaplikasikan adalah metode usus terbalik [Aminah S dan Nusratini, 2010].

Protokol uji standar telah diaplikasikan untuk mendapatkan data

yang valid. Namun, dengan protokol yang ada, jumlah hewan uji tikus (*Rattus norvegicus*) yang diperlukan cukup banyak, karena replikasi dan komparasi dilakukan pada segmen usus sepanjang total 20 cm pada lokasi yang sama dari hewan uji yang berbeda. Pada pengujian standar dengan membandingkan dua kondisi dan tiga replikasi, diperlukan enam tikus, padahal segmen usus halus (intestin) tikus dewasa sebagai lokasi absorpsi utama memiliki panjang total 80-100 cm [Miller DL, 1971], sehingga banyak bagian yang terbuang.

Penggunaan lokasi yang sama pada segmen usus halus ditujukan untuk memastikan validitas pengujian pada keperluan komparasi dan replikasi 5 [Departemen Farmasetika Fakultas Farmasi UGM, 2010]. Namun, validitas

hasil pengujian bila dilakukan pada segmen usus halus di lokasi yang berbeda belum pernah diuji. Pada penelitian ini, akan dilakukan pengujian validitas data hasil uji pada protokol menggunakan lokasi segmen usus halus yang berbeda dan akan dibandingkan dengan data hasil pengujian yang dilakukan secara konvensional pada segmen usus yang sama pada hewan uji yang berbeda.

Metodologi

Bahan Penelitian

Tikus putih jantan, Ketamin 10% (Kepro, Holand). Dapar pH 1,2 terdiri dari HCl 37% (Merck, Jerman), NaCl (Merck) dan akuades. Dapar pH 7,5 terdiri dari NaH_2PO_4 (Merck), NaOH (Merck) dan akuades. Larutan NaCl fisiologis, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (Merck), ZnSO_4 (Merck), gas Oksigen.

Alat Penelitian

Tabung Crane dan Wilson (rancangan Yuwono), penangas air (Selecta, digiterm 100), sentrifuse (Hettich, EBA 8), spektrofotometer (Thermo Scientific GenesysTM 10)

Pengujian absorpsi metode usus terbalik

Sebelum dilakukan pengujian, tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 20-24 jam dengan hanya diberikan minum air masak. Selanjutnya hewan uji dikorbankan dengan injeksi intramuskular 1 mL ketamin 10% (Kepro, Holland). Segmen usus yang digunakan adalah segmen usus halus yang ditandai dengan pengukuran, dimulai dari segmen 10 cm setelah pirolus.

Metode yang digunakan adalah dengan teknik kantung usus halus dibalik, sehingga villi berada di bagian luar [Aminah S dan Nusratini, 2010]. Percobaan dilakukan pada suhu 37°C. Kompartemen mukosal diisi dengan 75

ml larutan asam salisilat 0,1 M dalam dapar pH 1,2 dan larutan asam salisilat 0,1 M dalam dapar pH 7,5. Kompartemen serosal diisi dengan 1,4 ml larutan NaCl fisiologis. Usus yang sudah berisi cairan serosal dimasukkan dalam tabung Crane dan Wilson yang sudah diisi larutan mucosal dan dialiri gas oksigen dengan kecepatan 100 gelembung per menit. Selanjutnya tabung diinkubasi dalam penangas air. Sampling dilakukan selama 4 kali dengan selang waktu 15 menit. Kemudian pada 1 ml sampel ditambah 2 ml larutan 0,3N $\text{Ba}(\text{OH})_2$ dan 2 ml larutan 5% ZnSO_4 dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Beningan (supernatan) dibaca absorbansinya secara spektrofotometri.

Perbedaan penggunaan hewan uji

Pada protokol konvensional yang telah dikembangkan, digunakan 10 cm segmen paling atas sebagai perlakuan, selanjutnya 10 cm berikutnya sebagai kontrol blanko. Pada protokol yang akan diuji validitasnya, selanjutnya digunakan lagi 10 cm segmen berikutnya untuk perlakuan dan 10 cm segmen di bawahnya untuk kontrol blanko, sehingga total 40 cm segmen usus yang digunakan, dimana ada metode konvensional hanya 20 cm. Profil absorpsi dari kedua pengujian ini selanjutnya dibandingkan.

Analisis data

Pada semua data dilakukan analisis statistika deskriptif dan normalitas data. Selanjutnya perbandingan dilakukan dengan menggunakan unpaired t-test dengan koreksi Welch. Seluruh uji statistik dilakukan pada taraf kepercayaan 95% dan dinyatakan signifikan pada $p < 0,05$. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan software GraphPad Prism 8.

Hasil

Analisis dilakukan pada usus yang memperoleh perlakuan yang sama dalam pengujian transport asam salisilat pada pH 7,5, namun pada segmen yang berbeda (20 cm awal terhadap 20 cm selanjutnya. Diambil sampel dari 6

individu tikus, dan diperoleh hasil seperti pada Tabel 1-4. Berdasarkan hasil yang telah didapatkan, baik pada tes menggunakan metode Shapiro-Wilk maupun Kolmogorov-Smirnov, data dinyatakan terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji hipotesis secara parametrik.

Tabel 1. Data percobaan jumlah obat kumulatif setelah 45 menit [6]

20 cm atas (µg)	20 cm lanjutan (µg)
26,1	30,7
49,3	40,3
28,0	24,5
36,9	34,0
31,8	54,9
46,5	78,1

Tabel 2. Statistika deskriptif

Parameter	20 cm pertama (µg)	20 cm lanjutan (µg)
Jumlah (n)	6	6
Nilai terkecil	26.14	24.45
Nilai terbesar	49.30	78.10
Range	23.16	53.65
Rerata	36.44	43.74
Standard deviasi	9.650	19.77
Standard error of mean	3.940	8.070
Koefisien variasi	26.48%	45.19%

Tabel 3. Uji normalitas (metode Shapiro-Wilk Test)

Parameter	20 cm atas (µg)	20 cm lanjutan (µg)
W	0.9055	0.8961
P value	0.4077	0.3512
Distribusi normal?	Ya	Ya
Keterangan P value	Tidak signifikan	Tidak signifikan

Tabel 4. Uji normalitas (metode Kolmogorov-Smirnov Test)

Parameter	20 cm atas (µg)	20 cm lanjutan (µg)
W	0.1847	0.2357
P value	>0.1000	>0.1000
Distribusi normal?	Ya	Ya
Keterangan P value	Tidak signifikan	Tidak signifikan

Tabel 5. Signifikansi perbedaan antara penggunaan segmen usus 20 cm atas dan bawah (Student's t-test)

Unpaired t-test dengan koreksi Welch	
P value	0.442
Keterangan P value	Tidak signifikan
Berbeda signifikan? (P < 0.05)	Tidak
1 atau 2-tailed?	2-tailed
Koreksi Welch t, df	t=0,8127; df=7,255

Dari hasil analisis perbandingan antara asam salisilat yang tertransport

pada pH 7,5 pada segmen usus di 20 cm pertama dengan 20 cm selanjutnya,

diperoleh hasil bahwa kedua set data tidak berbeda signifikan. Ini berarti bahwa keduanya memberikan hasil yang secara statistik sebanding.

Pembahasan

Penggunaan usus tikus sebagai membran uji transport obat secara *in vitro* tidak dapat dihindarkan, karena relatif murah dan mudah diperoleh, sehingga sangat efisien (Crane and Wilson, 1958, Wolfe et al, 1973, Perrier and Gibaldi, 1973). Namun, penggunaan hewan uji dalam jumlah besar masih dapat dikurangi jumlahnya dengan optimalisasi prosedur. Panjang usus tikus dapat mencapai 80-100 cm (Miller, 1971), sedangkan pada uji transport obat secara usus terbalik, pada tiap uji hanya diperlukan sepanjang 20 cm dengan rincian 10 cm untuk sampel dan 10 cm berikutnya untuk kontrol blanko (Departemen Farmasetika Fakultas Farmasi UGM, 2010). Secara teoritis, usus halus pada segmen berikutnya masih memiliki sifat yang sama dan secara hipotesis dapat dimanfaatkan juga untuk pengujian.

Pada studi ini, dilakukan perbandingan antara data jumlah asam salisilat kumulatif pada pH 7,5 pada segmen usus di 20 cm awal dan 20 cm selanjutnya dari dua waktu percobaan yang berbeda. Waktu percobaan pertama adalah data percobaan praktikum dari mahasiswa program sarjana Fakultas Farmasi UGM yang mengikuti praktikum pada tahun 2018 saat metode konvensional masih sepenuhnya digunakan, dan waktu percobaan kedua adalah di tahun 2019 saat skema hewan uji terbatas diberlakukan. Data tahun 2018 diambil sebagai referensi segmen usus 20 cm awal, sedangkan data tahun 2019 diambil sebagai referensi protokol baru yang ditawarkan dimana segmen 20 cm lanjutan digunakan. Persyaratan data

yang digunakan dalam analisis pada studi ini adalah: (1) Profil kurva tidak menunjukkan adanya kebocoran, (2) setiap data diperoleh dari individu tikus yang berbeda, dan (3) Data segmen usus 20 cm lanjutan merupakan usus yang telah mengalami penyimpanan selama 3-4 jam dalam suhu 20°C (kulkas) di dalam dapar akuades. Usus sepanjang 20 cm terbagi menjadi dua segmen, 10 cm atas digunakan untuk uji sampel dan 10 cm bawah digunakan untuk kontrol blanko.

Dari analisis statistik diperoleh hasil bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara kedua set data, seperti dipaparkan pada tabel 5. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan segmen usus tikus (intestin) pada lokasi mulai 30 cm dari pirolus masih memberikan hasil yang sebanding dengan lokasi segmen 10 cm setelah pirolus. Hasil ini menjelaskan hipotesis bahwa selama sepanjang segmen intestin yang digunakan, semestinya memberikan profil absorpsi obat yang sama karena memiliki morfologi yang tidak berbeda.

Miller (1971) melaporkan dalam studinya bahwa variasi panjang usus dapat dipengaruhi oleh faktor fisik seperti berat badan tikus, namun tidak disebutkan bahwa hal ini akan menyebabkan perbedaan ketebalan usus secara signifikan, khususnya pada segmen usus yang masih sama, misal pada jejunum. Perbedaan signifikan mungkin terjadi antara segmen yang berbeda, misal antara duodenum, jejunum, dan ileum. Namun, dalam percobaan ini, hanya segmen jejunum yang digunakan, sehingga dari hasil penelitian ini kami berhasil mengkonfirmasi bahwa selama masih berada pada segmen jejunum, maka segmen usus sepanjang 40 cm, dimulai dari 15 cm setelah pirolus, tidak memberikan perbedaan yang signifikan

dalam hal permeabilitasnya terhadap obat uji yaitu asam salisilat.

Dengan demikian, penggunaan segmen usus hingga sepanjang 40 cm dari jejunum dapat dilakukan, bahkan untuk membandingkan dua sampel yang berbeda, karena memiliki dimensi yang tidak berbeda signifikan. Menurut Hukum Fick tentang difusi senyawa melalui membran, transport obat melalui membran usus hanya dipengaruhi oleh faktor luas permukaan, permeabilitas, gradien konsentrasi, dan tebal membran (Won and Ramkhina, 2019). Dalam percobaan yang kami lakukan selama praktikum, kesemua faktor ini merupakan faktor yang masuk ke dalam kontrol variabel, sehingga perbedaan yang tidak signifikan ini dapat diperoleh.

Kesimpulan

Dari hasil studi ini kami menyarankan efisiensi penggunaan tikus dalam uji biofarmasetika transport obat secara usus terbalik menggunakan hewan uji tikus, untuk menggunakan segmen hingga 50 cm setelah pilorus karena memberikan hasil yang tidak berbeda signifikan. Hal ini dapat mengurangi jumlah hewan uji yang digunakan.

Daftar Pustaka

- Siddiqui MR, Al Othman ZA, dan Rahman R, Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review, *Arabian Journal of Chemistry* 2017, 10(10): S1409-21
- Homayun B, Lin X, dan Choi HJ, Challenges and recent progress in oral drug delivery systems for biopharmaceuticals, *Pharmaceutics* 2019, 11(3): 129.
- Aminah S dan Nusratini, Absorpsi in vitro sulfametoksazol dengan polisorbate 80: Tinjauan termodinamika, *majalah Farmaseutik* 2010, 6(2): 1-6
- Miller DL, Rat small intestine: Development, composition, and effect of perfusion, *The American Journal of Digestive Disease* 1971, 16: 147-54
- Departemen Farmasetika Fakultas Farmasi UGM, Buku Petunjuk Praktikum Biofarmasetika, Fakultas Farmasi UGM, 2010
- Crane RK and Wilson TH, In vitro method for the study of the rate of intestinal absorption of sugars, *J Appl Physiol* (1958), 12(1): 145-6
- Wolfe DL, Forland SC, and Benet LZ, Drug transfer across intact rat intestinal mucosa following surgical removal of serosa and muscularis externa (1973), 62(2): 200-5
- Perrier D and Gibaldi M, Animal model for investigating intestinal drug absorption: Various antibiotics, *J Pharm Sci* (1973), 62(9): 1486-90
- Prihapsara F, Saputra WA, Artanti AN, Ermawati DE, Rohmani S, and Yugatama A, Permeability of Piroxicam with sodium lauryl sulfate as surfactant, *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* (2019), 578: 012054
- Won YY and Ramkhina D, Revised formulation of Fick's, Fourier's, and Newton's Laws for Spatially Varying Linear Transport Coefficients, *ACS Omega* (2019), 4(6): 11215-22