

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah: gelas beaker (*pyrex*[®]), icebox (*rubbermaid*[®]), kandang hewan uji, labu ukur (*pyrex*[®]), neraca analitik (*Mettler toledo XS 205*), seperangkat alat bedah, spatula, spuit injeksi oral (*Terumo*[®]), spuit injeksi (*OneMed*[®]), timbangan tikus (*Ohaus*[®]).

3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: akuades, alkohol 70%, formalin 10%, kapas, ketamin dan *xylazin*, pakan AD-2, dan produk SOLUDIA[®].

3.1.3 Kriteria Subjek Uji

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah tikus Wistar sejumlah 5 ekor dengan kriteria inklusi antara lain dalam keadaan sehat, berjenis kelamin betina, tikus berusia 1-2 bulan, berat badan 140 mg-200 mg. Sedangkan kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah tikus yang sakit dan terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah aklimatisasi dan hamil.

3.2 Prosedur Penelitian

3.2.1 Pengajuan *Ethical Clearence*

Pengajuan *Ethical Clearence* ditujukan kepada Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Pengajuan EC bertujuan untuk memastikan bahwa metode yang digunakan telah memenuhi kaidah etik.

3.2.2 Persiapan Hewan Uji

Sebelum diberikan perlakuan, 5 ekor tikus Wistar dilakukan adaptasi selama 7 hari di Laboratorium Farmakologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia. Seluruh tikus dikandangkan dalam wadah plastik berukuran 50x40x10cm yang ditutup kawat di atasnya dan beralaskan sekam yang diganti setiap 3 hari sekali. Selain itu, hewan uji diberi makan berupa pakan dan minum *ad libitum*. Kandang hewan uji tersebut berada pada ruangan yang bebas dari kebisingan, kebersihan terjaga dengan kelembaban ($\pm 50\%$), suhu 25°C , ventilasi cukup dan dengan cahaya gelap terang selama 12 jam sehari (BPOM RI, 2014). Setelah melalui masa adaptasi, hewan uji dipuaskan selama 10 jam dengan tetap diberikan air minum, dilakukan penimbangan berat badan, lalu diberi perlakuan berupa pemberian oral Produk SOLUDIA[®] sesuai dosis yang telah ditentukan berdasarkan metode OECD 425.

3.2.3 Persiapan Sampel

Pembuatan larutan stok berhubungan dengan volume pemejanan pada hewan uji. Adapun volume pemejanan diberikan pada hewan uji berdasarkan berat badan masing-masing hewan uji, dengan tujuan untuk menghindari penimbangan secara berulang (BPOM RI, 2014). Pada penelitian ini menggunakan hewan uji sebanyak 5 ekor dengan volume pemejanan 2ml/200g. Berikut ini adalah perhitungan dosis produk SOLUDIA[®] 2000 mg/kgBB.

$$\begin{aligned} \text{Dosis} &= 2000 \text{ mg/kgBB} \\ &= \frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ g BB}} = \frac{X}{200 \text{ g BB}} \\ &= \frac{400 \text{ mg}}{200 \text{ g tikus}} \end{aligned}$$

Konsentrasi Stok

$$\frac{400 \text{ mg}/200\text{g tikus}}{2 \text{ mL}/200\text{g tikus}} = 200 \text{ mg/mL}$$

3.2.4 Uji Ketoksikan dengan Metode OECD 425

3.2.4.1 *Limit Test*

Dosis 2000 mg/kgBB diberikan kepada satu hewan uji. Jika hewan tersebut mati, selanjutnya dilakukan *main test* untuk menentukan LD₅₀. Namun jika hewan tersebut tetap hidup, maka dilakukan pemberian dosis pada empat hewan tambahan secara berurutan dengan dosis yang sama. Nilai LD₅₀ lebih besar dari 2000 mg/kgBB jika tiga atau lebih hewan dapat bertahan hidup (OECD, 2008).

3.2.4.2 *Main Test*

Main test dilakukan jika hewan uji mengalami kematian pada jumlah tertentu selama pengujian *limit test*. Hewan uji tunggal diberikan dosis secara berurutan dalam interval 48 jam yang ditentukan berdasarkan onset, durasi dan keparahan dari gejala ketoksikan. Pemberian dosis pada hewan uji pertama dengan ketentuan dosis di bawah perkiraan awal terbaik LD₅₀. Jika hewan uji selamat maka hewan kedua akan menerima dosis yang lebih tinggi dengan faktor kenaikan 3,2, begitupula jika sebaliknya (OECD, 2008).

3.2.5 Pembuatan Histopatologis Organ

Pengambilan organ diawali dengan mematikan hewan uji dengan pemberian ketamin 0,05 mL dan *xylazin* 0,05 mL secara intra muskular pada tikus terlebih dahulu, kemudian dilakukan emboli jantung. Setelah itu, tikus dibedah secara melintang untuk diambil organ hati dan ginjal. Organ-organ tersebut dicuci dengan larutan NaCl 0,9% dan difiksasi dengan larutan formalin 10% (BPOM RI, 2014).

Pmbuatan preparat dan pengamatan organ hati dan ginjal tikus secara mikroskopis dibantu oleh tenaga ahli di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Pertama-tama, membuat preparat organ berdiameter 1 cm yang telah diawetkan dengan formalin 10%. Preparat tersebut diletakkan pada *slide* kaca dan diwarnai dengan *Hematoxylin strain* untuk melihat perubahan patologis pada organ tersebut. Data hasil histopatologis tersebut kemudian diinterpretasikan untuk melihat adanya perubahan dengan menggunakan mikroskop (BPOM RI, 2014).

3.3 Analisis Hasil

3.3.1 Analisis kuantitatif

3.3.1.1 Perubahan Berat Badan

Perubahan berat badan yang didapatkan, diolah secara statistik menggunakan *one way* (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 95%. Pengujian *one way* (ANOVA) ini dilakukan untuk melihat potensi produk SOLUDIA[®] terhadap perubahan berat badan hewan uji.

3.3.1.2 Nilai LD₅₀

Penentuan nilai LD₅₀ dilakukan untuk menentukan batas keamanan suatu dosis. Pada *limit test*, ketika dosis telah diberikan pada 5 hewan uji dan jika tiga atau lebih hewan uji tetap hidup maka LD₅₀ lebih besar dari 2000 mg/kgBB. Adapun jika tiga atau lebih hewan uji mengalami kematian maka LD₅₀ kurang dari 2000 mg/kgBB dan selanjutnya dilakukan *main test* (OECD, 2008).

3.3.2 Analisis Kualitatif

3.3.2.1 Gejala Ketoksikan

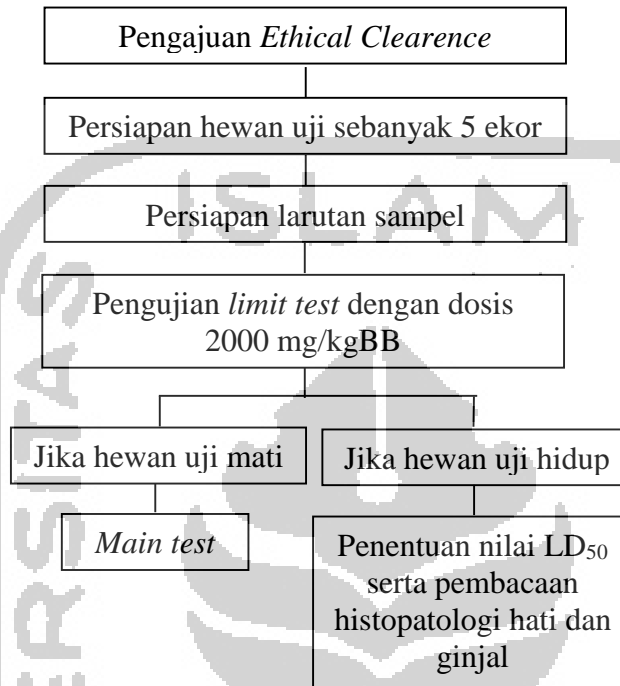
Gejala ketoksikan dievaluasi secara kualitatif menggunakan data hasil pengamatan terhadap perubahan perilaku hewan uji seperti kegelisahan, kepekaan terhadap rangsangan, sistem pencernaan, sistem kardiovaskular, sistem pernafasan, mukosa dan mata. Selain itu, pengamatan dilakukan terhadap gejala tremor, kejang, salivasi, diare, letargi, lemah, tidur dan koma. Pengamatan meliputi intensitas munculnya gejala dan adanya kematian (BPOM RI, 2014).

3.3.2.2 Histopatologis organ Hati dan Ginjal Tikus

Pemeriksaan histopatologis organ hewan uji secara mikroskopis dilakukan dengan membandingkan kondisi organ yang diteliti dengan kondisi normal. Pengamatan dilakukan pada preparat organ yang diletakkan dibawah mikroskop dengan perbesaran tertentu sehingga dapat diketahui jika ada ketoksikan pada organ.

3.4 Skema Penelitian

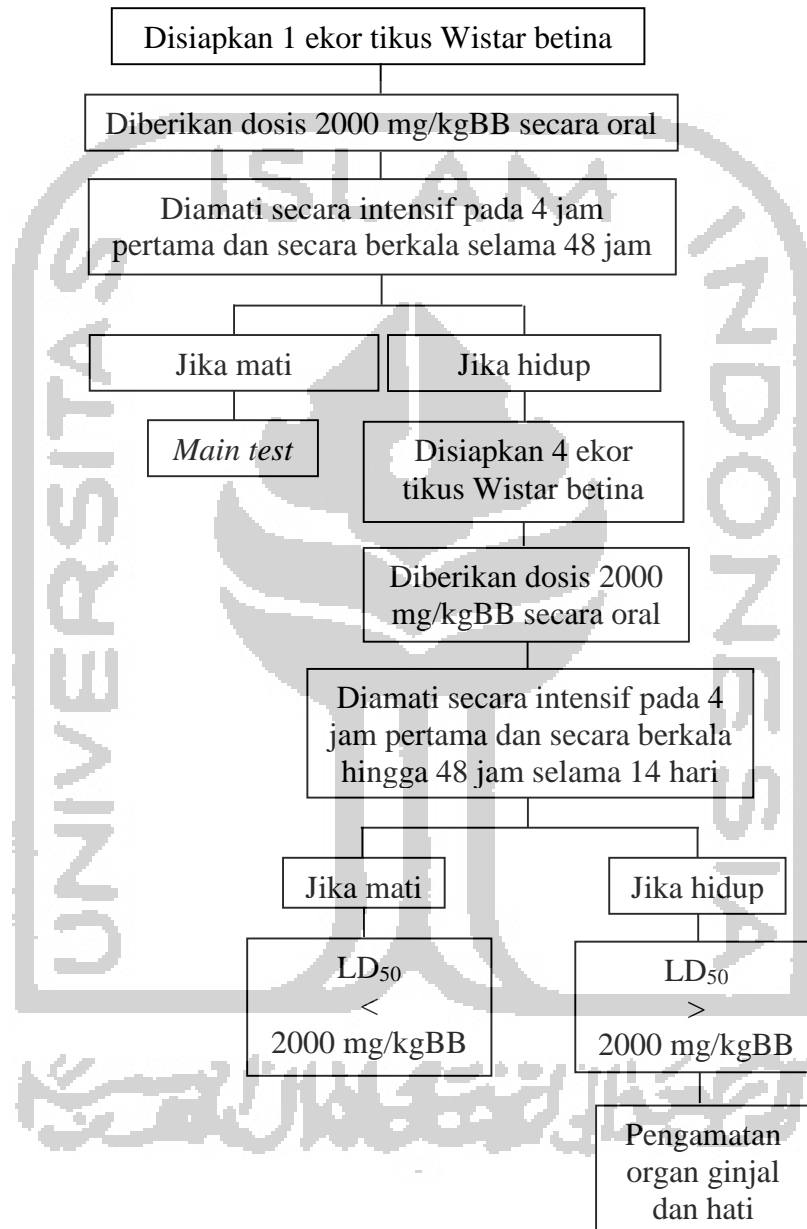
3.4.1 Skema Penelitian Umum



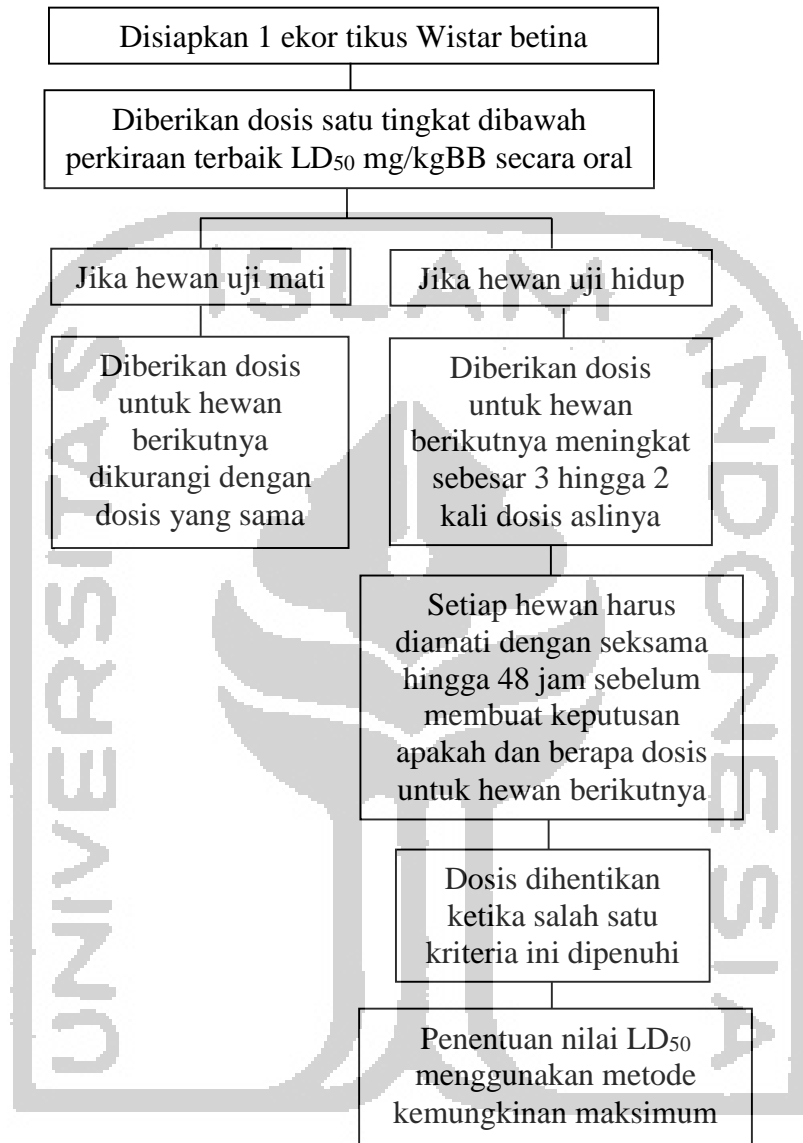
Gambar 3.1 Skema Penelitian Umum

3.4.2 Skema Penelitian Uji Toksisitas Akut

3.4.2.1 Limit Test



Gambar 3.2 Skema Penelitian Uji Toksisitas Akut *Limit test*

3.4.2.2 *Main Test*

Gambar 3.3 Skema Penelitian Uji Toksisitas Akut *Main test*