

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (*Mettler toledo Xs 205*), timbangan tikus (*Ohaus triple beam balance*), alat-alat gelas, alat-alat bedah, pot wadah organ, kawat, spuit oral 5ml (*Terumo*), dan kandang hewan uji.

3.1.2 Bahan

3.1.2.1 Bahan Uji

Bahan yang digunakan adalah produk YACONA[®], formalin 10 %, kapas, akuades, pakan AD-2, dan *ketamine, xylazine*.

3.1.2.2 Subjek Uji

Subjek uji yang digunakan adalah tikus Wistar sebanyak 5 ekor. Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah tikus galur Wistar, berkelamin betina, keadaan sehat, umur 1-2 bulan, berat badan 140-200 gram. Sedangkan kriteria eksklusi adalah hewan uji yang tampak sakit (penampakan rambut rontok, aktifitas kurang atau kurang aktif, sakit), terdapat penurunan atau kenaikan berat badan diatas 10% setelah aklimatisasi.

3.2 Prosedur Penelitian

3.2.1 Pengajuan *Ethical Clearance* (EC)

Ethical Clearance (EC) diajukan kepada Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan mengisi dan menyerahkan formulir EC serta proposal masing-masing tiga rangkap.

3.2.2 Aklimatisasi Hewan Uji

Aklimatisasi dilakukan sebelum proses penelitian yakni selama 5-7 hari.

Selama penelitian berlangsung, tikus dikandangkan dalam wadah berbahan plastik dengan ukuran 50x40x10cm yang ditutup kawat di atasnya dan beralaskan sekam, pembersihan kandang dan pergantian sekam dilakukan selama 3 hari sekali. Tiap kandang dihuni 5-7 ekor tikus dengan diberi makan berupa pellet dan diberi air minum *ad libitum*. Kemudian, kandang-kandang tersebut ditempatkan pada ruangan yang sama dengan kelembaban udara yang tetap ($\pm 50\%$), suhu 25°C , ventilasi cukup dengan pengaturan cahaya gelap terang 12 jam sehari.

3.2.3 Penyiapan Larutan Sampel

Disiapkan produk YACONA[®] sebagai sampel metode OECD 425. Dosis yang digunakan untuk *Limit test* yakni 2000mg/kgBB (Anonim, 2001a) dengan volume pemejanaan 2ml/200g.

$$\begin{aligned}
 \text{Dosis} &= 2000\text{mg/kg BB} \\
 &= \frac{2000\text{mg}}{1000 \text{ g BB}} \cdot \frac{x}{200 \text{ g}} \\
 &= \frac{400 \text{ mg}}{200 \text{ g tikus}} \\
 \text{Konsentrasi stok} &= \frac{400\text{mg}/200\text{g tikus}}{2 \text{ ml}/200\text{g tikus}} \\
 &= 200\text{mg/ml} \\
 \text{Yang dibutuhkan} &= 5 \text{ ekor tikus} \times 2 \text{ ml} \\
 &= 10 \text{ ml} \\
 \text{Volume total} &= 200 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} \\
 &= 2000 \text{ mg}/10 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

Dilarutkan produk YACONA[®] 2000mg dalam 10ml akuades.

3.2.4 Uji Ketoksikan Metode OECD 425

3.2.4.1 *Limit test*

Limit test dilakukan dengan pemberian dosis tunggal pada satu hewan uji. Jika hewan tersebut mati, lakukan *main test* untuk menentukan LD₅₀. Jika hewan tersebut bertahan hidup, diberikan dosis keempat hewan tambahan secara berurutan sehingga total lima hewan diuji. Namun, jika tiga hewan mati, *limit test* diakhiri dan *main test* dilakukan. Nilai LD₅₀ lebih besar dari 2000 mg/ kg

jika tiga atau lebih hewan bertahan hidup. Uji *limit test* dilakukan guna melihat sisi keamanan senyawa. Pengamatan gejala ketoksikan dilakukan selama 48 jam, dan dilanjutkan selama 14 hari.

3.2.5 Pengamatan Gejala

Pengamatan dilakukan selama 24 jam pertama dengan 4 jam pengamatan secara intensif kemudian dilanjutkan pengamatan selama 20 jam. Jika tidak terdapat hewan yang menunjukkan gejala toksik dilanjutkan pengamatan selama 48 jam kemudian 14 hari, selanjutnya dibedah untuk mengetahui kondisi organ hewan uji. Berikut adalah gejala toksik yang diamati :

Tabel 3. 1 Tanda Umum Ketoksikan

Sistem Organ	Pengamatan	Tanda umum ketoksikan
Tubuh	Perilaku	Perubahan perilaku, gelisah
Sistem saraf pusat (ssp) dan Sistem saraf somatomotor	- Gerakan - Keaktifan terhadap rangsangan	- Kedutan, tremor - Beringas, aktif serta pasif
Pernafasan	Laju nafas dan kelelahan	Terengah-engah dll
Pencernaan	Defekasi	Diare, sembelit, tinja hitam
Sistem saraf otonom	Sekresi	saliva
Membran mukosa	Mukosa mulut	Kongesti, pendarahan
Kulit dan Bulu	Warna dan keutuhan	Rontok, kemerahan dll
Kematian	Mati	Mati

Sumber (Anonim, 2001a).

3.2.6 Pengambilan Organ

Sebelum pengambilan organ, terlebih dahulu tikus disuntik ketamin kemudian dilakukan emboli jantung. Selanjutnya, tikus dibedah untuk diambil organ hati dan ginjal. Organ-organ tersebut disimpan dalam larutan formalin 10%. Untuk pembuatan preparat dan pemeriksaan histopatologis organ hati dan ginjal dikirim ke Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

3.2.7 Pengamatan Mikroskopis Organ

Pengamatan organ secara mikroskopis diawali dengan pembuatan 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. Pada setiap slide kaca dapat diisikan dua sampai tiga preprat organ. Preparat yang sudah terbentuk kemudian diinterpretasikan untuk melihat adanya perubahan dengan menggunakan mikroskop. Adapun proses interpretasi hasil histopatologi ini dibantu tenaga ahli di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada (UGM).

3.3 Analisis Hasil

3.3.1 Analisis Kuantitatif

3.3.1.1 Perubahan Berat Badan

Data perubahan bobot tikus antar tikus yang diperoleh diolah secara statistik menggunakan analisis *one way* (ANOVA). Uji dengan *one way* (ANOVA) ini dilakukan untuk melihat apakah pemberian produk YACONA® dapat mempengaruhi berat badan tikus Wistar.

3.3.1.2 Nilai LD₅₀

Penentuan nilai LD₅₀ diperoleh dari jumlah kematian hewan uji pada pemberian dosis tunggal 2000mg/kgBB. Dari total 5 hewan uji jika bertahan 3 atau lebih hewan uji maka nilai LD₅₀ lebih dari 2000mg/kgBB. Namun jika terdapat 3 atau lebih hewan uji yang mati maka nilai LD₅₀ kurang dari 2000mg/kgBB.

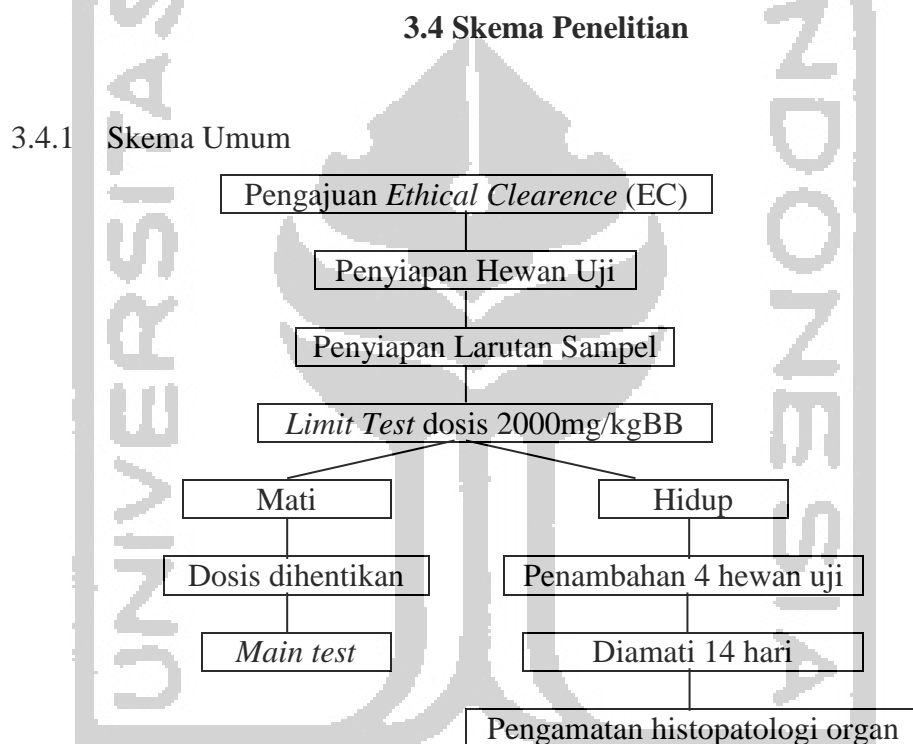
3.3.2 Analisis Kualitatif

3.3.2.1 Gejala Toksik

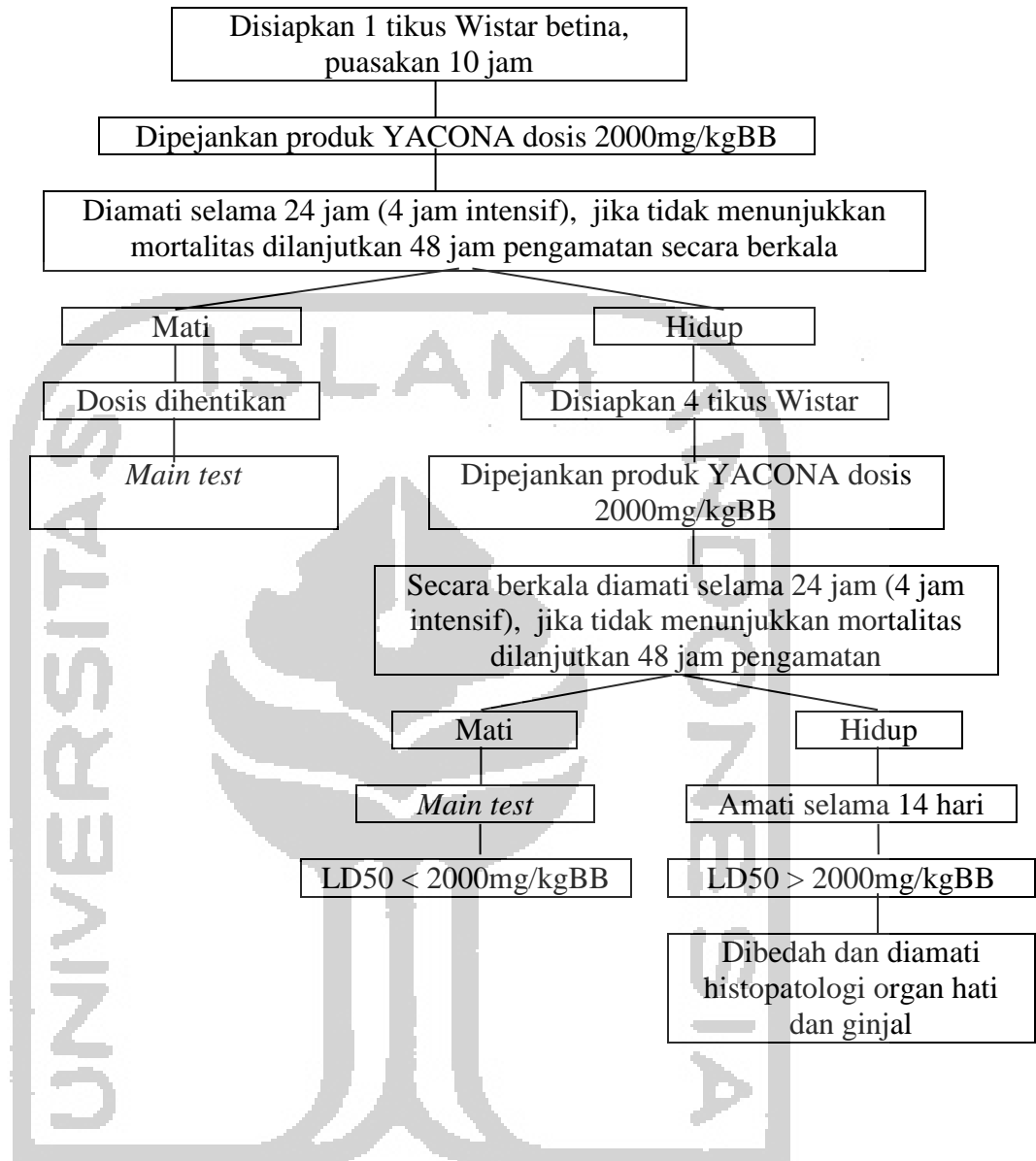
Gejala toksik diperoleh secara kuantitatif menggunakan data yang diperoleh dari hasil pengamatan gejala-gejala toksik yang nampak pada perilaku, mukosa, kulit, bulu, kepekaan terhadap rangsangan dan lain sebagainya. Pengamatan dilakukan selama 14 hari terhadap sistem pernafasan, pencernaan, somatomotor, kardiovaskular, mukosa, kulit dan bulu. Pengamatan yang dilakukan meliputi waktu timbul dan hilangnya gejala toksik serta saat terjadinya kematian.

3.3.2.2 Mikroskopis Organ

Organ yang telah diisolasi dalam larutan formalin 10% (hati dan ginjal) dibuat preparat sebelum dilakukan pembacaan. Gambaran histopatologi organ hewan uji dilakukan dengan cara mengamati preparat yang telah dibuat dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x, kemudian hasil pembacaan yang didapatkan dibandingkan dengan gambaran histopatologi kondisi normal untuk mencari ada tidaknya ketoksikan pada organ hewan uji.



3.4.2 Uji Limit Test 2000mg/kgBB



UNIVERSITAS ISLAM AL-AZHAR