



**BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA**

PERATURAN BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
NOMOR 18 TAHUN 2021
TENTANG
PEDOMAN UJI FARMAKODINAMIK PRAKLINIK
OBAT TRADISIONAL

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

- Menimbang : a. bahwa uji farmakodinamik praklinik obat tradisional merupakan metode yang diterapkan untuk pengembangan obat tradisional melalui pembuktian khasiat secara ilmiah sebelum beredar untuk memenuhi persyaratan keamanan, khasiat, dan mutu;
- b. bahwa untuk meningkatkan daya saing serta guna mendukung percepatan pengembangan industri farmasi khususnya industri obat tradisional, perlu diatur mengenai uji farmakodinamik praklinik obat tradisional;
- c. bahwa berdasarkan ketentuan Pasal 6 ayat (1) huruf d Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 007 Tahun 2012 tentang Registrasi Obat Tradisional, Badan Pengawas Obat dan Makanan berwenang mengatur kriteria obat tradisional yang berkhasiat yang dibuktikan secara ilmiah sehingga dapat diberikan izin edar;

- d. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a, huruf b, dan huruf c, perlu menetapkan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan tentang Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional;

- Mengingat :
1. Peraturan Presiden Nomor 80 Tahun 2017 tentang Badan Pengawas Obat dan Makanan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2017 Nomor 180);
 2. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 007 Tahun 2012 tentang Registrasi Obat Tradisional (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 226);
 3. Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 21 Tahun 2020 tentang Organisasi dan Tata Kerja Badan Pengawas Obat dan Makanan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2020 Nomor 1002);

MEMUTUSKAN:

- Menetapkan : PERATURAN BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN TENTANG PEDOMAN UJI FARMAKODINAMIK PRAKLINIK OBAT TRADISIONAL.

Pasal 1

Dalam Peraturan Badan ini yang dimaksud dengan:

1. Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional adalah bagian dari pembuktian khasiat secara ilmiah melalui uji untuk mempelajari efek obat tradisional terhadap fungsi berbagai organ tubuh pada hewan uji yang dilakukan untuk bahan baku dan/atau produk jadi.
2. Obat Tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan, dan dapat diterapkan sesuai dengan norma yang berlaku di masyarakat.
3. Pendaftar adalah industri Obat Tradisional, usaha kecil Obat Tradisional, usaha mikro Obat Tradisional, importir

di bidang Obat Tradisional yang telah mendapat izin usaha sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan atau lembaga penelitian/riset yang mengajukan permohonan persetujuan pelaksanaan Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional.

4. Evaluator adalah pegawai di lingkungan Badan Pengawas Obat dan Makanan yang berdasarkan surat penunjukan dan surat tugas dari pejabat yang berwenang bertugas untuk melakukan evaluasi dan/atau penilaian terhadap permohonan evaluasi protokol dan/atau data Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional yang diajukan oleh Pendaftar.
5. Lembaga Penelitian/Riset adalah lembaga yang berbentuk badan hukum atau bukan badan hukum yang didirikan dan berkedudukan dalam wilayah hukum Negara Kesatuan Republik Indonesia yang melakukan kegiatan penelitian, pengembangan, pengkajian, penerapan, dan invensi serta inovasi yang terintegrasi di bidang Obat Tradisional.

Pasal 2

- (1) Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional sebagai acuan bagi:
 - a. Evaluator dalam melaksanakan evaluasi terhadap khasiat Obat Tradisional berdasarkan pembuktian ilmiah protokol dan/atau data Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional; atau
 - b. Pendaftar dalam melaksanakan:
 1. Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional termasuk penyiapan data farmakodinamik praklinik untuk mendukung aspek khasiat Obat Tradisional dalam rangka registrasi Obat Tradisional; dan
 2. penelitian/riset serta pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang Obat Tradisional.

- (2) Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional sebagaimana dimaksud pada ayat (1) meliputi:
 - a. pedoman umum; dan
 - b. Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional berdasarkan kelas terapi.
- (3) Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional sebagaimana dimaksud pada ayat (2) tercantum dalam Lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan Badan ini.

Pasal 3

Pendaftar sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) huruf b dapat menggunakan metodologi lain berdasarkan referensi ilmiah yang sah dan/atau metode yang tervalidasi setelah mendapat persetujuan dari Badan Pengawas Obat dan Makanan.

Pasal 4

Peraturan Badan ini mulai berlaku pada tanggal diundangkan.

Agar setiap orang mengetahuinya, memerintahkan pengundangan Peraturan Badan ini dengan penempatannya dalam Berita Negara Republik Indonesia.

Ditetapkan di Jakarta
pada tanggal 7 Juli 2021

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

ttd.

PENNY K. LUKITO

Diundangkan di Jakarta
pada tanggal 9 Juli 2021

DIREKTUR JENDERAL
PERATURAN PERUNDANG-UNDANGAN
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
REPUBLIK INDONESIA,

ttd.

WIDODO EKATJAHJANA

BERITA NEGARA REPUBLIK INDONESIA TAHUN 2021 NOMOR 788

Salinan Sesuai Dengan Aslinya
BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN

Kepala Biro Hukum dan Organisasi,



Reghi Perdana

LAMPIRAN
PERATURAN BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
NOMOR 18 TAHUN 2021
TENTANG
PEDOMAN UJI FARMAKODINAMIK PRAKLINIK OBAT
TRADISIONAL

PEDOMAN
UJI FARMAKODINAMIK PRAKLINIK OBAT TRADISIONAL

BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Obat Tradisional di Indonesia dapat berupa Jamu, Obat Herbal Terstandar (OHT) atau Fitofarmaka. Jamu merupakan warisan leluhur bangsa Indonesia yang patut dibanggakan. Sejak dahulu jamu dipercaya berkhasiat untuk menjaga kebugaran tubuh. Namun demikian, seiring perkembangan sains dan teknologi, kini jamu perlu dikembangkan menjadi Obat Herbal Terstandar (OHT) dan Fitofarmaka dengan memperhatikan aspek keamanan, khasiat, dan mutu. Sinergitas berbagai pihak baik pemerintah, industri, akademisi, maupun komunitas lain perlu dimaksimalkan untuk pengembangan potensi Obat Tradisional di Indonesia melalui riset yang berkelanjutan. Obat Herbal Terstandar adalah hasil pengembangan dari Obat Tradisional dimana telah dilakukan standardisasi terhadap bahan bakunya serta keamanan dan khasiatnya telah dibuktikan secara ilmiah melalui uji praklinik. Fitofarmaka merupakan hasil pengembangan dari Obat Tradisional dimana telah dilakukan standardisasi terhadap bahan baku dan produk jadinya serta keamanan dan khasiatnya telah dibuktikan secara ilmiah melalui uji praklinik dan uji klinik.

Pengembangan Obat Tradisional saat ini juga menjadi tren yang terjadi di setiap Perguruan Tinggi di Indonesia yang dibuktikan dengan banyaknya penelitian yang bersumber pada ekstrak tumbuhan sebagai bahan bakunya. Penelitian ditujukan sebagai pembuktian ilmiah bahwa Obat Tradisional tersebut memiliki efek farmakologi sesuai dengan yang

diharapkan. Pembuktian ilmiah yang memadai menjadi hal yang sangat penting agar Obat tradisional dapat diterima oleh tenaga kesehatan pada pelayanan kesehatan formal. Selain itu, dinamika masyarakat saat ini juga menuntut kejelasan keamanan dan khasiat dari Obat Tradisional yang dikonsumsi sehingga Obat Tradisional yang telah dibuktikan lebih lanjut secara ilmiah sangat diperlukan.

Konsumsi terhadap produk Obat Tradisional cenderung terus meningkat seiring dengan perubahan gaya hidup masyarakat. Keamanan, khasiat, dan mutu produk Obat Tradisional di peredaran dikawal oleh Badan POM dalam Sistem Pengawasan Obat dan Makanan (SisPOM) yang dapat mendeteksi, mencegah dan mengawasi produk obat dan makanan dalam melindungi keselamatan konsumen. SisPOM meliputi pengawasan prapemasaran (*premarket*) dan pascapemasaran (*postmarket*) termasuk Obat Tradisional, sehingga SisPOM perlu diperkuat melalui evaluasi data praklinik dan data klinik yang valid dan dapat dipercaya. Untuk itu Badan POM harus tetap mengikuti dinamika perkembangan teknologi serta dinamika internasional yang terkait dengan penentuan aspek keamanan, khasiat dan mutu dalam rangka melindungi keselamatan masyarakat pengguna.

Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional digunakan sebagai acuan dalam melakukan uji praklinik pada hewan uji untuk membuktikan khasiat Obat Tradisional secara ilmiah. Prosedur penanganan hewan uji dalam pelaksanaan Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional dilakukan oleh tenaga terlatih dan menerapkan cara berlaboratorium hewan uji yang baik serta prinsip etik penelitian hewan laboratorium 3R yang meliputi *Replacement*, *Reduction* dan *Refinement*.

B. Maksud dan Tujuan

Pedoman ini berisi patofisiologi penyakit dan metodologi pengujian termasuk prosedur penggunaan hewan uji yang dapat dijadikan acuan dalam melakukan Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional untuk kelas terapi yaitu antihipertensi, antidislipidemia, antiobesitas, antihiperurisemia, antihiperqlikemia, antidiare nonspesifik, antiinflamasi, pereda batuk, pereda nyeri dan pereda demam. Pedoman ini dapat dimanfaatkan oleh:

1. Evaluator Badan Pengawas Obat dan Makanan dalam melaksanakan evaluasi terhadap khasiat Obat Tradisional

berdasarkan pembuktian ilmiah protokol dan/atau data uji farmakodinamik praklinik.

2. Pendaftar dalam melaksanakan uji farmakodinamik praklinik terhadap Obat Tradisional dalam rangka menyiapkan data farmakodinamik praklinik untuk mendukung aspek khasiat Obat Tradisional dalam rangka registrasi Obat Tradisional.
3. Lembaga Penelitian/Riset dalam melaksanakan penelitian/riset serta pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang Obat Tradisional.

C. PENGERTIAN UMUM

1. Jamu adalah Obat Tradisional yang dibuat di Indonesia.
2. Obat Herbal Terstandar adalah produk yang mengandung bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan dan dapat diterapkan sesuai dengan norma yang berlaku di masyarakat yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinik dan bahan bakunya telah distandardisasi.
3. Fitofarmaka adalah produk yang mengandung bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinik dan uji klinik serta bahan baku dan produk jadinya telah distandardisasi.

BAB II

PEDOMAN UMUM

A. Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*)

Pada setiap uji yang menggunakan hewan harus mendapatkan Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*) dari Komisi Etik untuk hewan.

B. Persetujuan Pelaksanaan Uji Praklinik (PPUPK)

Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional dalam rangka registrasi Obat Tradisional dapat dilaksanakan setelah memperoleh Persetujuan Pelaksanaan Uji Praklinik (PPUPK) dari Badan Pengawas Obat dan Makanan.

C. Penerapan Cara Berlaboratorium Hewan Uji yang Baik

Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional dilaksanakan di laboratorium hewan uji. Laboratorium hewan uji menerapkan cara berlaboratorium hewan uji yang baik yang dapat mengacu pada *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* yang terkini atau pada Peraturan Menteri Pertanian Nomor 44/Permentan/OT.140/5/2007 Tahun 2007 tentang Pedoman Berlaboratorium Veteriner yang Baik (*Good Veterinary Laboratory Practice*).

Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian Nomor 44/Permentan/OT.140/5/2007 Tahun 2007, sarana fisik dan lingkungan laboratorium hewan uji yang diperlukan adalah sebagai berikut:

1. Bangunan dan sarana fisik:

- a. Bersifat permanen, kuat dan mudah dalam pemeliharaannya;
- b. Memiliki fasilitas sumber air yang memadai;
- c. Memiliki sumber energi listrik dan cahaya yang memadai/cukup untuk menerangi ruangan;
- d. Memiliki ruang yang cukup luas untuk ruang gerak petugas dan alat-alat;
- e. Memiliki sistem ventilasi yang baik;
- f. Memiliki dinding kedap air, tidak korosif, mudah dibersihkan dan didesinfeksi;
- g. Memiliki sistem pengatur suhu ruang;
- h. Memiliki langit-langit yang tidak mudah mengelupas dan memiliki

bentuk yang lengkung/tidak membentuk sudut pada pertemuan antara dinding dengan lantai dan dinding dengan dinding sehingga tidak terjadi akumulasi kotoran;

- i. Memiliki lantai yang rata, halus, kuat, tidak licin, tidak mudah pecah, kedap air, terbuat dari bahan yang tahan terhadap zat-zat kimia dan api, mudah dibersihkan dan didesinfeksi;
- j. Memiliki pintu, jendela, dan kusen terbuat dari bahan bukan kayu, tidak korosif, kedap air, tidak toksik, dan tahan hama;
- k. Tersedia fasilitas meja laboratorium yang tahan terhadap bahan kimia, air, rayap dan tidak korosif;
- l. Tersedia ruangan yang terpisah dengan baik untuk pengujian yang berbeda dan tidak saling mempengaruhi;
- m. Tersedia fasilitas pengendalian akses keluar masuk ruangan laboratorium tertentu; dan
- n. Tersedia fasilitas untuk melakukan kegiatan pengujian yang menggunakan hewan uji.

2. Peralatan

Peralatan yang dipergunakan dalam pemeriksaan dan pengujian harus memenuhi persyaratan sebagai berikut:

- a. Disesuaikan dengan ruang lingkup pemeriksaan dan pengujian;
- b. Ketelusuran (*traceability*) dan dikalibrasi secara berkala;
- c. Dirawat dan ditempatkan pada tempat yang sesuai dengan fungsinya;
- d. Dilengkapi dengan petunjuk penggunaan alat dan buku catatan pemakaian;
- e. Mempunyai penanggung jawab sesuai jenis dan fungsi peralatannya;
- f. Dioperasikan oleh petugas yang memiliki kompetensi sesuai bidangnya;
- g. Dibersihkan dan dikembalikan pada tempatnya sesuai dengan kondisi semula;
- h. Prosedur perawatan dan pemakaian harus didokumentasikan;
- i. Mempunyai rekaman untuk setiap jenis peralatan yang mencakup spesifikasi dan informasi dari produsen mengenai pembuat alat, nama peralatan, nama pabrik, identitas jenis dan nomor seri, letaknya pada saat ini, kondisi saat diterima, dan petunjuk

penggunaan alat; dan

- j. Mencantumkan tanggal hasil kalibrasi, jadwal rencana perawatan yang akan dilakukan serta riwayat terjadinya kerusakan dan atau perbaikan peralatan yang telah dilakukan.

3. Lingkungan

Lingkungan laboratorium harus memenuhi persyaratan sebagai berikut:

- a. Kelayakan lingkungan, tata ruang untuk sebuah laboratorium veteriner;
- b. Memiliki sistem dan fasilitas pengelolaan limbah; dan
- c. Memiliki sistem pencegahan gangguan serangga dan hewan pengganggu seperti tikus, dan binatang pengerat lainnya.

D. Pengelolaan Sediaan Uji

1. Preparasi Sediaan Uji

Sediaan uji dapat berupa bahan baku atau produk jadi yang terstandardisasi, baik dalam bentuk bahan tunggal maupun dalam kombinasi sesuai dengan komposisinya. Sediaan uji dapat dibuat dengan bermacam-macam cara, sesuai dengan sifat sediaan uji dan cara pemberiannya. Sediaan uji jika diperlukan dapat dilarutkan pada cairan pembawa yang *inert*, dengan ketentuan sebagai berikut:

- a. Jika sediaan uji larut air maka dilarutkan dalam air.
- b. Jika sediaan uji sukar larut air atau tidak larut air maka disuspensikan/diemulsikan dengan pelarut/agen pensuspensi/agen pengemulsi yang sesuai misalnya CMC (*carboxy methyl cellulose*) 0,3 – 1,0 %, minyak nabati (misalnya minyak zaitun, minyak wijen, dan minyak jagung) atau pelarut lain yang lazim digunakan.
- c. Jika sediaan uji sudah dalam bentuk cairan dapat langsung diberikan tanpa dilarutkan pada cairan pembawa.

Bila produk akhir berbentuk sediaan khusus maka untuk membuktikan manfaatnya harus dibuktikan melalui pengujian khusus.

2. Volume Pemberian dan Dosis Sediaan Uji

- a. Volume Pemberian Sediaan Uji Secara Oral

Volume cairan maksimal yang dapat diberikan tergantung pada

ukuran (berat badan) setiap hewan uji. Pada rodensia, jumlah normalnya tidak melampaui 1 mL/100 g berat badan, namun bila pelarutnya air (*aqueous*) dapat diberikan hingga 2 mL/100 g berat badan. Bila pelarutnya air (*aqueous*), pada tikus dengan berat badan >250 g, batas volume maksimal yang dapat diberikan adalah 5 mL, dan pada mencit dengan berat badan >50 g, batas volume maksimal yang dapat diberikan adalah 1 mL. Pemilihan cairan untuk suspensi/emulsi dengan media air lebih dianjurkan daripada dalam media minyak. Bila menggunakan minyak sebagai pembawa, volume pemberian dengan jumlah normal 0,4 mL/100 g berat badan, dan apabila menggunakan pelarut lain maka karakteristik toksisitas cairan pembawa harus diketahui dengan jelas.

b. Dosis Sediaan Uji

- 1) Untuk Obat Tradisional yang telah memiliki Nomor Izin Edar, dosis yang disetujui digunakan sebagai dosis tengah. Kelompok dosis pertama merupakan penurunan dari dosis tengah, dosis ketiga merupakan kenaikan dari dosis tengah. Dosis dikonversikan dari manusia ke hewan uji.
- 2) Untuk Obat Tradisional yang belum memiliki Nomor Izin Edar dapat dilakukan dengan uji pendahuluan dan/atau berdasarkan literatur.

Konversi dosis antar jenis subjek uji misalnya dari dosis penggunaan pada manusia ke dosis pada hewan uji dapat mengikuti Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1. Konversi Dosis antar Jenis Subjek Uji berdasarkan Laurence dan Bacharach (1964).

	Mencit (20 g)	Tikus (200 g)	Marmut (400 g)	Kelinci (1,5 kg)	Satwa Primata (4 kg)	Anjing (12 kg)	Manusia (70 kg)
Mencit (20 g)	1,0	7,0	12,25	27,8	64,1	124,2	387,9
Tikus (200 g)	0,14	1,0	1,74	3,9	9,2	17,8	56,0

Marmot (400 g)	0,08	0,57	1,0	2,25	5,2	10,2	31,5
Kelinci (1,5 kg)	0,04	0,25	0,44	1,0	2,4	4,5	14,2
Satwa Primata (4 kg)	0,016	0,11	0,19	0,42	1,0	1,9	6,1
Anjing (12 kg)	0,008	0,06	0,10	0,22	0,52	1,0	3,1
Manusia (70 kg)	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,16	0,32	1,0

E. Pengelolaan Hewan Uji

1. Pemilihan dan Penanganan Hewan Uji

Pada prinsipnya jenis hewan yang digunakan untuk uji farmakodinamik sebaiknya adalah hewan model yang sudah teruji (*established*). Bila hewan model ini belum ada, maka pemilihan jenis hewan harus mempertimbangkan sensitifitas, cara metabolisme sediaan uji yang serupa dengan manusia, serta mudah tidaknya penanganan saat pengujian. Hewan pengerat merupakan jenis hewan yang memenuhi persyaratan tersebut di atas, sehingga paling banyak digunakan pada uji farmakodinamik. Hewan yang digunakan harus diketahui asal perolehan, jenis dan galur, jenis kelamin, usia, berat badan, dan harus sehat. Biasanya digunakan hewan dengan variasi bobot tidak lebih dari 20% serta belum pernah digunakan dalam pengujian lain. Adapun kriteria hewan yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kriteria hewan uji yang digunakan dalam uji farmakodinamik

No	Jenis hewan	Bobot minimal	Rentang umur
1	Mencit	20 g	6 – 8 minggu
2	Tikus	120 g	6 – 8 minggu
3	Marmut	250 g	4 – 5 minggu
4	Kelinci	1800 g	8 – 9 bulan

2. Pemeliharaan dan Aklimatisasi Hewan Uji

Ruangan yang digunakan untuk pengujian hendaknya memenuhi persyaratan suhu, kelembaban, cahaya dan kebisingan yang sesuai dengan kebutuhan hidup hewan uji, yaitu suhu ruangan diatur menjadi $22^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$, dengan kelembaban relatif 30–70%, dan penerangan 12 jam terang 12 jam gelap. Ruangan harus selalu dijaga kebersihannya. Hewan diberi pakan dan minum yang sesuai standar laboratorium dan diberikan *ad libitum* kecuali tujuan penelitian yang memerlukan pakan khusus atau pembatasan asupan pakan.

Hewan dipelihara dalam kandang yang terbuat dari material yang kedap air, kuat, dan mudah dibersihkan, ruang pemeliharaan bebas dari kebisingan. Luas area kandang per ekor hewan menurut *National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2011) seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Luas area kandang per ekor hewan uji

Hewan Uji	Bobot Badan (g)	Luas Kandang minimal (cm²)	Tinggi Kandang minimal (cm)
Mencit	15-25	80	15
Tikus	100-200	150	20
Marmut	250-350	300	20
Kelinci	2000-4000	400	40

Sebelum perlakuan hewan uji diaklimatisasi terlebih dahulu selama 5-7 hari. Seluruh hewan uji yang digunakan sebaiknya ditentukan nilai normal terhadap parameter yang akan diujikan.

3. Uji Pendahuluan Keberhasilan dan Kestabilan Induksi Hewan Uji

Apabila hewan uji memerlukan induksi dengan metode uji tertentu, sebaiknya dilakukan uji pendahuluan pada saat induksi untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

4. Randomisasi dan Cara Penandaan Hewan Uji

Hewan uji dilakukan randomisasi dengan secara acak dimasukkan ke dalam setiap kelompok sesuai dengan pengelompokan hewan uji. Setelah pengacakan, tidak ada perbedaan yang signifikan dalam rata-rata berat badan antar kelompok. Jika diperlukan, setelah pengacakan tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap kadar parameter tertentu yang akan dievaluasi (misalnya tekanan darah atau kadar glukosa darah) pada setiap kelompok hewan uji setelah dilakukan induksi. Jika terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik, maka langkah pengacakan harus diulangi, jika memungkinkan.

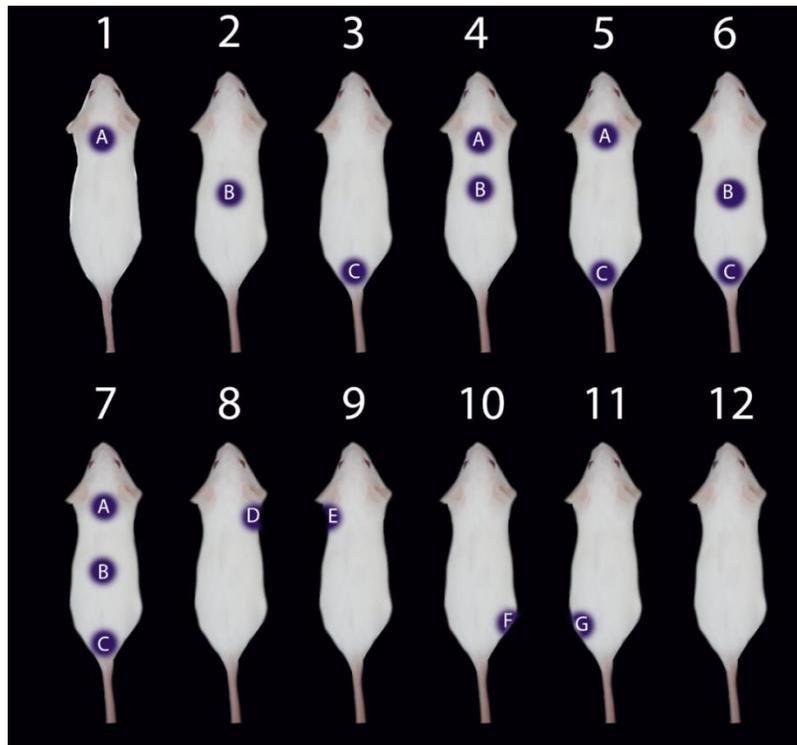
Nilai normal parameter hewan uji dapat dilihat pada Tabel 4 di bawah ini. Nilai normal parameter hewan uji dapat juga mengacu ke literatur lain yang valid.

Tabel 4. Nilai Normal Hewan Uji

Parameter	Tikus	Mencit	Marmut	Kelinci
<i>Serum Glutamic Pyruvate Transaminase (SGPT) (IU/L)</i>	10-50	25-100	-	25-70
<i>Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGOT) (IU/L)</i>	45-100	64-180	-	10-35
<i>Alkaline phosphatase (IU/L)</i>	50-150	20-55	-	40-120
Albumin (g/dL)	3,3-4,2	2,5-4,2	-	3,5-4,7
Kreatinin (mg/dL)	0,3-0,9	0,2-0,8	-	0,8-1,6
<i>Creatine Kinase (IU/L)</i>	50-300	-	-	20-1000
Kolesterol total (mg/dL)	50-100	80-130	20-80	20-60
Glukosa (mg/dl)	100-175	81-165	60-130	100-175

Setiap hewan harus diberi nomor identifikasi unik, dan diberi tanda secara permanen. Penandaan hewan uji dapat dilakukan dengan cara memberikan penanda yang sesuai (misalnya penanda yang tidak toksik atau *food grade*) atau larutan asam pikrat 10% dalam alkohol. Penggunaan larutan asam pikrat sebaiknya dihindari karena berisiko meledak dan membahayakan personil maupun fasilitas. Penandaan dilakukan dengan tujuan membedakan antara

hewan satu dengan yang lainnya. Penandaan biasanya dilakukan seperti pada Gambar 1 dan Tabel 5.



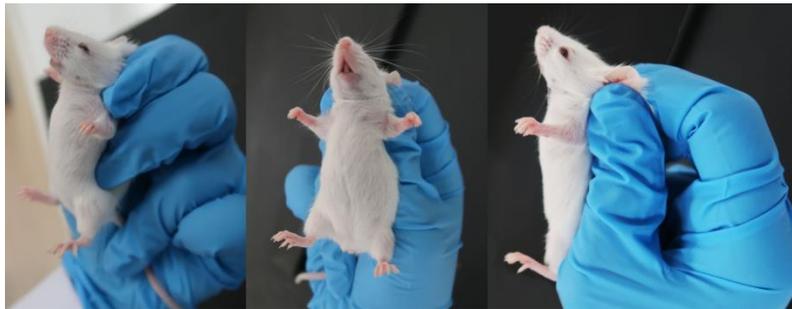
Gambar 1. Tempat penandaan hewan uji pada beberapa bagian tubuh hewan (sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

Tabel 5. Tempat penandaan hewan uji

No Hewan	Tanda	Tempat
1	A	Kepala
2	B	Punggung
3	C	Ekor
4	A & B	Kepala & Punggung
5	A & C	Kepala & Ekor
6	B & C	Punggung & Ekor
7	A, B & C	Kepala, Punggung & Ekor
8	D	Kaki kanan depan
9	E	Kaki kiri depan
10	F	Kaki kanan belakang
11	G	Kaki kiri belakang
12	-	Tidak diberi tanda apapun

5. Cara Memegang (*handling*) Hewan Uji

Cara memegang hewan uji jenis rodensia berbeda antara tikus dan mencit pada saat pemberian sediaan uji secara oral. Pemegangan yang benar sangat diperlukan sewaktu pemberian sediaan uji, karena pemegangan yang salah dapat berakibat fatal. Cara pemegangan yang salah dapat menyebabkan antara lain: sediaan uji yang diberikan tidak dapat masuk kedalam lambung tetapi masuk kedalam paru-paru, sehingga mengakibatkan kematian hewan uji. Disisi lain, pemegangan yang salah juga dapat mengakibatkan kecelakaan kerja seperti tergigit oleh hewan. Cara pemegangan hewan yang benar dapat dilihat pada Gambar 2, 3 dan 4.



Gambar 2. Cara memegang mencit

(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)



Gambar 3. Cara memegang tikus

(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)



Gambar 4. Cara memegang kelinci

(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

6. Pengambilan dan Penanganan Darah Hewan Uji

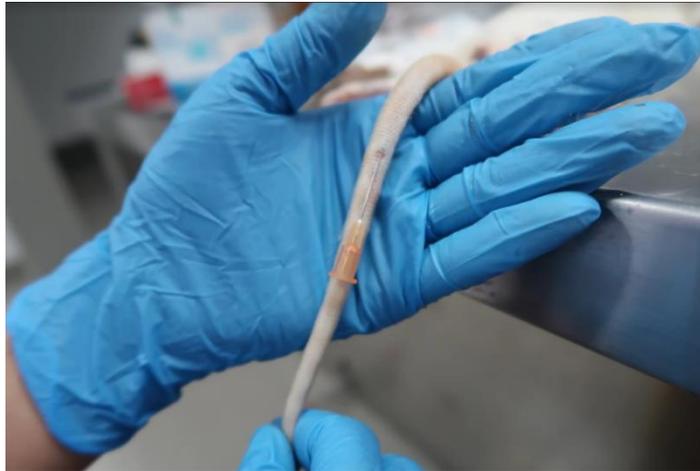
a. Pengambilan Darah Hewan Uji

Pengambilan darah menggunakan alat suntik steril atau alat yang sesuai yang steril dan selalu dijaga agar tidak terjadi hemolisis. Pada umumnya pengambilan darah yang terlalu banyak pada hewan kecil akan menyebabkan syok hipovolemik, stres, dan bahkan dapat menyebabkan kematian. Pengambilan darah yang tidak sesuai aturan juga dapat menyebabkan anemia pada hewan pengujian. Pada umumnya pengambilan darah hanya dilakukan sekitar 10% dari total volume darah pada tubuh hewan uji dalam selang waktu 2-4 minggu (total volume darah adalah 79 mL/kg berat badan pada mencit dan 64 mL/kg berat badan pada tikus), atau sekitar 1% dari berat tubuh dengan interval 24 jam. Batas maksimal koleksi darah yang tidak merisikokan keselamatan hewan (*one time sampling*) adalah 7,7 mL/kg berat badan untuk mencit dan 5,5 mL/kg berat badan untuk tikus.

Pengambilan darah dapat dilakukan melalui:

1) Ekor

Darah dapat diperoleh dengan mudah pada saluran perpendikularis pada permukaan ekor. Pengambilan sampel darah melalui vena lateral atau arteri ventral ekor mudah dilakukan, dan memungkinkan untuk dilakukan pengulangan (Gambar 5). Koleksi dapat dilakukan dengan *syringe* maupun hanya dengan jarum untuk langsung ditampung ke dalam vial.



Gambar 5. Pengambilan darah tikus di ekor

(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

2) Mata

Hewan sebelumnya dianestesi, lokasi pengambilan darah pada sinus retro-orbitalis mata dengan menggunakan pipet Pasteur atau tabung hematokrit. Aplikasi dapat dilakukan dengan menusukkan pipet dengan sudut kemiringan 45° . Sampel dapat diperoleh dari kedua mata secara bergantian (Gambar 6). Metode ini dapat menghasilkan volume darah dalam jumlah besar, namun dapat mengakibatkan trauma pada mata dan kebutaan (terutama pada tikus) sehingga harus dilakukan oleh personil yang kompeten. Koleksi darah melalui perlukaan retro-orbital lebih umum dilakukan pada mencit dan tidak disarankan pada hewan tikus karena memerlukan beberapa syarat khusus.



Gambar 6. Pengambilan darah tikus di mata

(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

3) Vena jugularis

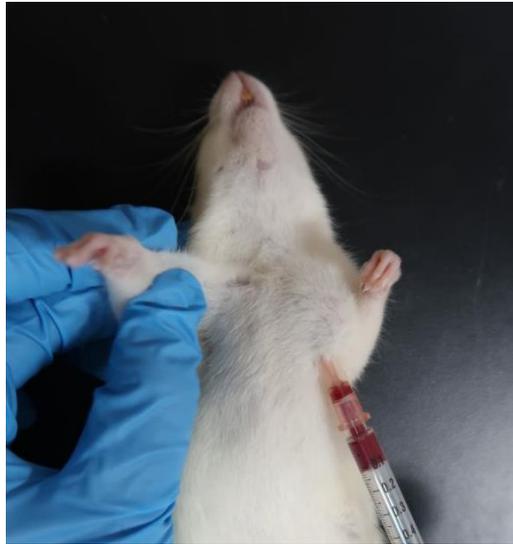
Setelah hewan dianestesi, darah diambil dari vena jugularis secara perlahan-lahan menggunakan alat suntik steril, dan satu alat suntik digunakan untuk satu hewan (Gambar 7). Dihindari pembentukan hematoma dan harus dilakukan penekanan di lokasi tusukan selama minimal 30 menit.



Gambar 7. Pengambilan darah tikus di vena jugularis
(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

4) Intrakardium

Teknik ini dilakukan pada hewan yang terbius sebagai metode terminal (di akhir uji) dan umumnya jika darah yang dibutuhkan banyak dan tikus yang diambil darahnya ini akan dikorbankan lalu dinekropsi untuk diambil organnya (Gambar 8). Setelah dilakukan anestesi dan eutanasia, kemudian dilakukan pembedahan dan tusukkan jarum suntik langsung ke jantung dan tarik perlahan. Teknik ini dapat pula dilakukan tanpa harus membuka rongga toraks, yakni dengan mengakses jantung dari sisi kiri dada, merasakan/palpitasi denyut jantung lalu memasukkan jarum antara iga ke 3 dan 5, lalu koleksi secara perlahan.



Gambar 8. Pengambilan darah tikus di intrakardium
(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

5) Vena saphena

Koleksi dari rute ini dapat dilakukan dalam kondisi hewan terbius maupun tidak, sepanjang hewan dikendalikan (*restraint*) dengan baik dan kaki belakang dapat diakses dengan leluasa. Darah dapat dikoleksi dari vena saphena lateral yang terletak agak di dorsal kaki belakang lalu menyilang lateral diatas persendian tarsal. Kaki belakang perlu ditahan lalu sedikit ditarik agar posisi ekstensi. Bagian kaki tepat diatas persendian perlu diberi sedikit tekanan untuk memudahkan proses koleksi.



Gambar 9. Pengambilan darah di Vena saphena
(sumber: (Sharp & Villano, 2012))

6) Vena submandibularis

Teknik ini lebih umum diaplikasikan pada mencit. Prosedur dapat dilakukan dengan lanset khusus maupun dengan jarum dengan sudut 30°. Hewan harus dikendalikan dengan posisi jari menahan/mencubit rambut di area tengkuk (*scruff*) untuk memudahkan mengekspos area pipi. Orientasi menusukkan jarum atau lanset adalah pada titik di

tengah pipi, yaitu area sejajar dengan canthus lateral mata dan di atas titik keabuan di garis rahang (*jawline*).



Gambar 10. Pengambilan darah di Vena submandibularis
(sumber: (Sharp & Villano, 2012))

b. Penanganan Darah Hewan Uji

Untuk memperoleh serum, darah total (*whole blood*) dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit, kemudian dipindahkan ke dalam es tidak lebih dari 20 menit dan segera disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan segera dalam lemari beku (-20⁰ C) untuk *assay*.

Jika diinginkan plasma, maka darah total (*whole blood*) diberikan Garam Etilen Diamin Tetraasetat (Na₂EDTA, K₂EDTA atau K₃EDTA) atau natrium sitrat atau heparin (antikoagulan). Garam EDTA paling banyak digunakan karena jarang berinterferensi dengan *assay* yang dilakukan. Umumnya digunakan kadar garam EDTA sebesar 1,5 mg/mL atau 5 mM pada konsentrasi akhir.

7. Cara Mengorbankan Hewan Uji

Setelah percobaan, hewan uji tersebut perlu dimusnahkan atau dikorbankan. Pada prinsipnya hewan uji dimusnahkan/dikorbankan sesuai dengan kaidah-kaidah cara dan teknik pengorbanan hewan sesuai Deklarasi Helsinki (2008) dan *American Veterinary Medical Association* (2020), dengan tahapan sebagai berikut:

a. Prinsip Eutanasia

Sebelum hewan uji dikorbankan, dilakukan anestesi terlebih dahulu. Hewan dipegang secara hati-hati tanpa menimbulkan rasa takut, lalu hewan dikorbankan dengan salah satu teknik di tempat terpisah dari hewan lain, dan dijaga agar tidak ada

hewan hidup disekitarnya. Eutanasia harus dilakukan oleh personil yang kompeten, dan disertai proses konfirmasi untuk memastikan kematian.

- b. Mengorbankan hewan uji dengan salah satu cara berikut :
 - 1) Dislokasi leher untuk hewan kecil seperti mencit/tikus (dengan berat badan kurang dari 200 gram).
 - 2) Cara anestesi secara inhalasi dengan obat bius *halogenated* (seperti halothane, isoflurane, sevoflurane) atau CO₂ (menggunakan *chamber* khusus). Penggunaan eter untuk anestesi dan eutanasia sudah tidak direkomendasikan.
 - 3) Cara anestesi dengan metode penyuntikan. Metode dengan penyuntikan obat bius dapat dilakukan menggunakan dosis yang disarankan untuk eutanasia (dosis letal) misalnya dengan ketamine dan xylazine, urethane atau pentobarbital.
 - 4) Cara pengeluaran darah (eksanguinasi) melalui vena jugularis atau arteri karotis yang sebelumnya dianestesi terlebih dahulu.

8. Pemusnahan Hewan Uji

Cara yang dipilih harus didasarkan pada kondisi tempat dan kapasitas tempat pemusnahan, serta cara tercepat memperoleh hasil dan kondisi yang dibutuhkan untuk menghilangkan agen penyebab penyakit. Metode yang umum digunakan untuk pemusnahan hewan mati adalah:

a. Rendering

Proses render merupakan penghancuran jaringan hewan uji secara mekanik dan pemanasan. Secara umum proses rendering meliputi penghancuran dan penggilingan jaringan diikuti dengan pemanasan dan tekanan tinggi. Proses *rendering* jaringan menghasilkan produk yang dapat bermanfaat misalnya lemak dan protein yang steril. Proses rendering tidak dapat membunuh penyakit prion (misalnya *Bovine Spongiform Encephalopathy* (BSE)).

b. Insinerasi (Pembakaran)

Teknik pembakaran diantaranya pirolisis, gasifikasi atau bentuk lain dari hasil pemanasan, dan dengan penghancuran karkas secara utuh menjadi abu. Tempat pembakaran permanen

memiliki saluran pembuangan gas yang memiliki beberapa manfaat dilihat dari sudut pandang lingkungan. Saluran pembuangan gas terhubung dengan ruang pasca pembakaran yang berguna untuk membakar gas hidrokarbon dan partikel - partikel dari ruang pembakaran utama.

c. Penguburan

Pada metode ini seluruh bangkai dikubur dalam tanah dengan kedalaman yang aman dari risiko penggalian antara lain oleh hewan liar di sekitar lokasi penguburan. Penguburan tidak dapat menginaktivasi seluruh patogen-patogen. Prosedur ini tidak memerlukan transportasi tambahan karena dapat dilakukan pada lokasi penelitian dan penyebaran penyakit lebih terkendali. Namun diperlukan kontrol lingkungan karena prosedur ini berpotensi mengkontaminasi air tanah dan diperlukan pengendalian terhadap kemungkinan penggalian oleh hewan liar yang dapat membahayakan lingkungan.

BAB III

UJI FARMAKODINAMIK PRAKLINIK OBAT TRADISIONAL BERDASARKAN KELAS TERAPI

A. ANTIHIPERTENSI

1. Patofisiologi Hipertensi

Patogenesis hipertensi melibatkan banyak faktor terutama faktor kardiovaskuler (*cardiac output*, resistensi perifer, vasokonstriksi) dan faktor renal (sodium, air, renin). Mekanisme neuronal seperti sistem saraf simpatis dan sistem endokrin juga terlibat pada regulasi tekanan darah. Oleh karena itu, sistem-sistem tersebut dapat merupakan target untuk terapi obat yang menurunkan tekanan darah.

Manusia dikatakan mengalami hipertensi jika tekanan darah sistolik lebih dari 140 mmHg dan diastolik lebih dari 90 mmHg, kriteria yang sama berlaku juga untuk tikus. Sedangkan tekanan darah normal ialah tekanan darah sistolik berada sekitar 120 mmHg dan diastolik 80 mmHg. Faktor risiko tekanan darah tinggi pada manusia antara lain umur, jenis kelamin, genetik, merokok, konsumsi garam, konsumsi alkohol, obesitas, kurang aktivitas fisik, dan stres.

Klasifikasi tekanan darah tinggi adalah sebagai berikut:

a. Berdasarkan penyebab

1) Hipertensi primer/Hipertensi esensial

Hipertensi yang penyebabnya tidak diketahui dan merupakan 90% penderita hipertensi, banyak dikaitkan dengan pola hidup dan faktor genetik. Metode menimbulkan hipertensi primer dapat dilakukan dengan induksi menggunakan retensi natrium.

2) Hipertensi sekunder/Hipertensi non-esensial

Hipertensi yang diketahui penyebabnya, antara lain penyakit ginjal (sekitar 5-10%), kelainan hormonal atau pemakaian obat (sekitar 1-2%) misalnya pil KB. Metode induksi untuk hipertensi sekunder dapat menggunakan metode induksi klip ginjal atau induksi dengan kortikosteroid.

b. Berdasarkan jenis hipertensi

Hipertensi diastolik, hipertensi sistolik, dan hipertensi campuran.

- c. Berdasarkan derajat hipertensi
Hipertensi ringan, hipertensi sedang, dan hipertensi berat.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Jika tersedia hewan uji standar hipertensi (misalnya *Spontaneously Hypertensive Rat* (SHR) maka digunakan hewan uji tersebut. Jika tidak tersedia, maka hewan uji diinduksi dengan pemberian zat tertentu seperti NaCl, adrenalin, angiotensin atau dilakukan klip ginjal. Hewan uji dipastikan telah mengalami peningkatan tekanan darah (pengukuran tekanan darah dilakukan sebelum dan setelah dilakukan induksi), yang kemudian diukur sebagai *baseline*. Selanjutnya diberikan sediaan uji selama waktu tertentu dan diamati penurunan tekanan darahnya. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan penurunan tekanan darah pada kelompok uji dengan kelompok kontrol menggunakan uji statistik yang sesuai. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

b. Metode Uji

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: kandang hewan uji, timbangan, *sputit injeksi*, sonde oral, alat pengukur tekanan darah dengan *tail cuff*, alat gelas, PVC-dilapisi klip, transduser dan alat bedah steril.
- b) Bahan: Sediaan uji, induktor/zat untuk meningkatkan tekanan darah (misalnya NaCl, *Deoxycorticoosterone acetat* (DOCA), Deksametason), obat anestesi (misalnya Ketamin HCl) dan obat standar antihipertensi (konversi dosis terapi manusia) yang diduga memiliki mekanisme kerja yang sama dengan bahan uji sebagai kontrol positif.
- c) Hewan uji yang digunakan adalah hewan model yang secara genetik telah mengalami hipertensi. Apabila tidak tersedia dapat digunakan tikus strain *Sprague-Dawley* atau Wistar yang diinduksi hipertensi.

2) Pengelompokan hewan uji

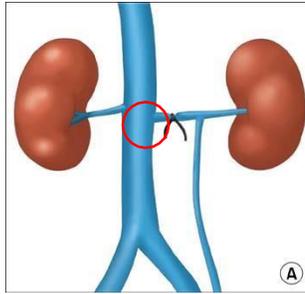
Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor. Hewan uji yang digunakan berjenis kelamin jantan, dikelompokkan sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi tekanan darah.
- b) Kontrol negatif (hewan uji hipertensi) diberi perlakuan induksi hipertensi, diberi pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi tekanan darah.
- c) Kontrol positif (hewan uji hipertensi) diberi perlakuan induksi hipertensi dan diberi obat standar (konversi dosis terapi manusia) yang telah diketahui manfaatnya.
- d) Kelompok perlakuan (hewan uji hipertensi) diberi perlakuan induksi hipertensi dan diberi bahan uji minimal tiga kelompok dosis.

3) Induksi hewan uji

Induksi hipertensi pada hewan uji dapat dilakukan dengan salah satu cara berikut:

- a) Hewan uji hipertensi karena kelainan ginjal akut
Konstriksi arteri ginjal dilakukan pada satu sisi dan ginjal kontralateral diikat. Setelah beberapa waktu terjadi peningkatan tekanan darah.
 - (1) Hewan uji dianestesi.
 - (2) Dilakukan laparotomi medianus atau insisi pada anterior umbilical sampai tulang rawan *xyphoideus*, dengan cara menyisihkan usus ke kanan.
 - (3) Pembukaan retroperitoneal akan memperlihatkan struktur ginjal dan sekitarnya, dilakukan pengikatan (ligasi) ginjal kiri yang dekat dengan vena cava inferior menggunakan *monofilamen* benang *polypropylene* 7-0 atau dengan menggunakan klem (Gambar 11).



Gambar 11. Pengikatan ginjal
(sumber: Ki *et al.*, 2010)

- (4) Pastikan drainase ginjal ke vena suprarenal, vena testis, dan vena renolumbar dipertahankan.
- (5) Penutupan dinding perut dilakukan dengan dijahit menggunakan benang kapas 3-0.
- (6) Setelah induksi dilakukan pengukuran tekanan darah secara berkala setiap minggu. Apabila tekanan darah sudah mencapai > 140 mmHg untuk sistolik dan > 90 mmHg untuk diastolik, pemberian sediaan uji sudah dapat dilakukan.

Pada kelompok normal juga dilakukan laparotomi tanpa pengikatan (ligasi) atau klem.

Pada metode induksi ini, pembanding obat standar yang disarankan yaitu golongan *Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor* (ACEI) seperti Captopril atau golongan *Angiotensin Receptor Blocker* (ARB) seperti Losartan, Kandesartan dan Irbesartan.

b) Induksi Hipertensi dengan NaCl atau DOCA-garam

- (1) Hewan uji diberi 4% NaCl atau DOCA-garam sesuai dengan dosis pada uji pendahuluan dalam air minum selama 14 hari sampai 4 bulan tergantung keberhasilan induksi.
- (2) Setelah induksi dilakukan pengukuran tekanan darah secara berkala setiap minggu. Apabila tekanan darah sudah mencapai > 140 mmHg untuk sistolik dan > 90 mmHg untuk diastolik (sebelum 4 bulan), pemberian sediaan uji sudah dapat dilakukan.
- (3) Induksi tetap dilakukan sampai pemberian sediaan uji dihentikan.

(4) Berat badan, asupan pakan dan asupan cairan masing-masing hewan uji diukur setiap minggu selama pemberian sediaan uji.

Pada metode induksi ini, pembanding obat standar yang disarankan yaitu golongan diuretik seperti Hidroklorotiazid, golongan *Calcium Channel Blocker* (CCB) seperti Amlodipin atau golongan *Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor* (ACEI) seperti Captopril.

c) Induksi Hipertensi dengan Deksametason.

Hewan uji diberi induksi deksametason 0,5 mg/kg BB/hari atau sesuai dengan dosis pada uji pendahuluan secara subkutan selama 14 hari atau tergantung keberhasilan induksi. Apabila tekanan darah sudah mencapai > 140 mmHg untuk sistolik dan > 90 mmHg untuk diastolik, pemberian sediaan uji sudah dapat dilakukan.

Pada metode induksi ini, pembanding obat standar yang disarankan yaitu golongan *Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor* (ACEI) seperti Captopril atau golongan *Angiotensin Receptor Blocker* (ARB) seperti Losartan, Kandesartan dan Irbesartan atau golongan *Calcium Channel Blocker* (CCB) seperti Amlodipin

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Hewan uji diberikan sediaan uji secara oral sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan sebelumnya. Senyawa induksi dan/atau prosedur induksi tetap diberikan sampai selesai pengujian. Sediaan uji diberikan setiap hari selama minimal 10 hari dan dapat diperpanjang sesuai dengan tujuan pemberian.

5) Pengukuran parameter hipertensi

Tekanan darah diukur 3 hari sekali dalam rentang waktu 3 jam setelah pemberian sediaan uji pada waktu yang sama sampai didapatkan tekanan darah yang stabil dan dapat dipercaya.

Parameter hipertensi yang diukur adalah tekanan darah sistolik dan diastolik ekor tikus, dilakukan dengan cara tidak

langsung menggunakan alat *Rat tail blood pressure monitoring system* atau metode *tail cuff* (manset-ekor) dengan cara seperti pada manual alat tersebut (Gambar 12). Pengukuran dengan alat tersebut, hewan uji harus dijaga lingkungannya agar tidak timbul stres pada hewan sehingga dapat mempengaruhi tekanan darah.



Gambar 12. Metode *tail cuff* untuk pengukuran tekanan darah

(Sumber: www.2biol.com)

c. Evaluasi

Evaluasi dilakukan dengan membandingkan penurunan tekanan darah antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol negatif. Selama pengujian yang diamati adalah berat badan, tekanan sistolik, tekanan diastolik, dan tekanan darah arteri rerata (TDAR) hewan uji. Data hasil pengujian dianalisis menggunakan metode analisis statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi klinik sebagai pertimbangan utama selain signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

B. ANTIDISLIPIDEMIA

1. Patofisiologi Dislipidemia

Dikenal lima jenis lipoprotein dalam darah yaitu kilomikron, *very low density lipoprotein* (VLDL), *intermediate density lipoprotein* (IDL), *low-density lipoprotein* (LDL), dan *high density lipoprotein* (HDL). Dislipidemia didefinisikan sebagai kelainan metabolisme lipid yang

ditandai dengan peningkatan kadar LDL, kolesterol total, trigliserida (TG), serta penurunan HDL. LDL merupakan lipoprotein aterogenik utama, dan dijadikan target utama untuk penatalaksanaan dislipidemia. HDL berkontribusi pada 20-30% dari total kolesterol serum. Keadaan hiperkolesterolemik ditandai dengan kenaikan kadar kolesterol darah di atas normal. Dislipidemia merupakan faktor risiko primer untuk penyakit jantung koroner (PJK) dan stroke. Pada tikus kadar kolesterol darah normal adalah 50–100 mg/dL.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Jika tersedia hewan uji standar dislipidemia maka digunakan hewan uji tersebut. Jika tidak tersedia, maka hewan uji diinduksi dengan pemberian pakan tinggi lemak sesuai metode yang berlaku. Hewan uji dipastikan mengalami peningkatan kadar LDL, kolesterol total, dan trigliserida yang kemudian diukur sebagai *baseline*. Selanjutnya diberikan sediaan uji selama waktu tertentu dan diamati perubahan parameter uji. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji yaitu kadar LDL, kolesterol total, trigliserida, dan HDL sebelum dan sesudah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

b. Metode Uji

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: kandang hewan, *sputit* injeksi, sonde oral, timbangan, alat gelas, spektrofotometer.
- b) Bahan: pakan tinggi lemak atau bahan lainnya yang dapat membuat hewan uji mengalami dislipidemia, obat standar, sediaan uji, dan pereaksi untuk menguji parameter dislipidemia.
- c) Hewan uji yang digunakan adalah hewan model yang secara genetik telah mengalami dislipidemia. Apabila tidak tersedia dapat menggunakan tikus jantan strain *Sprague-Dawley* atau

Wistar atau dapat menggunakan kelinci jantan yang diinduksi dislipidemia.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor tiap kelompok. Hewan uji dikelompokkan sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberikan pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi kadar kolesterol
- b) Kontrol negatif (hewan uji dislipidemia) diberi pakan tinggi lemak sampai akhir pengujian serta diberi juga pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi dislipidemia.
- c) Kontrol positif (hewan uji dislipidemia) diberi pakan tinggi lemak sampai akhir pengujian, serta diberi juga obat standar misalnya simvastatin (konversi dosis terapi manusia) yang dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- d) Kelompok perlakuan (hewan uji dislipidemia) diberi pakan tinggi lemak sampai akhir pengujian, serta diberi juga sediaan uji minimal pada tiga kelompok dosis yang berbeda.

3) Induksi hewan uji

- a) Peningkatan kadar lipid dalam darah hewan uji dapat dilakukan dengan cara pemberian pakan yang mengandung lemak dan kolesterol tinggi per oral (selama \pm 4 minggu) atau dengan cara lain sesuai hasil uji pendahuluan.
- b) Peningkatan kadar lipid dalam darah dapat dilakukan dengan memberikan Propil Tio Urasil (PTU) 0,01-0,2% atau 50-100 mg/kg atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan secara bersamaan dengan pakan tinggi lemak selama 5-7 hari atau dengan cara lain sesuai hasil uji pendahuluan.
- c) Dapat digunakan Triton WR1339 (*Tyloxapol* atau polimer tersier oksietilasi fenol formaldehida) dengan dosis 300 mg/kg berat badan dilarutkan dalam NaCl 5% atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan.

Induksi dilakukan sampai didapatkan keadaan dislipidemia yang dapat ditunjukkan dengan peningkatan kadar kolesterol total minimal 1,5 kali kadar kolesterol total dan peningkatan kadar LDL pada kelompok normal. Induksi dapat disesuaikan sampai diperoleh kondisi dislipidemia yang stabil dan dapat dipercaya. Kadar tersebut digunakan sebagai kadar baseline.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Pemberian sediaan uji per oral dilakukan setelah induksi dislipidemia berhasil. Sediaan uji diberikan secara per oral selama 4-6 minggu dan induksi pakan penyebab kondisi dislipidemia tetap diberikan sampai pemberian sediaan uji dihentikan.

5) Pengukuran parameter dislipidemia

Parameter dislipidemia yang diukur adalah kadar LDL *direct*, kolesterol total, trigliserida, dan HDL. Selama masa pengujian hewan uji ditimbang satu kali seminggu. Hewan diambil darahnya sehari setelah pemberian sediaan uji terakhir untuk mengukur kadar LDL *direct*, kolesterol total, trigliserida, HDL dengan metode penetapan yang sesuai. Hewan uji dipuasakan selama 8-10 jam dengan tetap diberi minum sebelum pengambilan darah. Untuk dapat memastikan efek farmakodinamik, diperlukan titik pengukuran di luar titik awal dan titik akhir proses uji farmakodinamik.

c. Evaluasi

Evaluasi dilakukan terhadap berat badan dan profil lipid (LDL *direct*, kolesterol total, trigliserida, dan HDL). Dilakukan analisis statistik untuk melihat homogenitas dan variasi antar kelompok, distribusi data kadar profil lipid. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji yaitu kadar LDL *direct*, kolesterol total, trigliserida, dan HDL sebelum dan sesudah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi klinik

sebagai pertimbangan utama selain signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

C. ANTI OBESITAS

1. Patofisiologi Obesitas

Menurut *World Health Organization* (WHO), obesitas didefinisikan sebagai penyakit akibat akumulasi lemak abnormal atau berlebihan yang dapat mengganggu kesehatan. Obesitas merupakan hasil dari ketidakseimbangan homeostatis energi kronis yaitu asupan energi melebihi pengeluarannya. Pada obesitas dapat terjadi hipertrofi (peningkatan volume jaringan adiposit), atau hiperplasia (peningkatan jumlah sel adiposit). Penelitian pada hewan menunjukkan hipertrofi adiposit terjadi sebelum hiperplasia adiposit. Penelitian yang menggunakan *Carbon-14* menunjukkan bahwa sel adiposit dibentuk terus menerus sepanjang hidup. Adiposit yang hipertrofi bersifat merusak dan berhubungan dengan sindrom metabolik, risiko penyakit kardiovaskular, diabetes melitus, kanker, peningkatan mortalitas, infertilitas, sindrom *polycystic ovary*, dan *sleep apnea*.

Penyebab mendasar terjadinya obesitas adalah ketidakseimbangan antara energi yang masuk (kalori yang diperoleh dari pangan) dan energi yang keluar (kalori untuk seluruh aktivitas). Secara umum obesitas terjadi akibat meningkatnya asupan pakan yang tinggi lemak dan kurangnya aktivitas fisik sehari-hari.

Obesitas pada tikus ditentukan berdasarkan indeks obesitas Lee. Tikus dinyatakan obesitas jika nilai indeks obesitas Lee > 0,30. Jika hasil diketahui kurang dari 0,30 tikus belum dinyatakan obesitas. Indeks obesitas Lee dihitung dengan rumus:

$$\text{Indeks Obesitas Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{Berat Badan (g)}}}{\text{Panjang Nasoanal (mm)}} \times 10$$

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Jika tersedia hewan uji standar obesitas maka digunakan hewan uji tersebut. Jika tidak tersedia, maka hewan uji diinduksi dengan pemberian pakan tinggi lemak dan karbohidrat atau metode lain yang

sesuai, dipastikan hewan uji mengalami kenaikan berat badan sesuai indeks obesitas Lee ($> 0,30$). Selanjutnya hewan uji diberi sediaan uji selama waktu tertentu dan diamati perubahan berat badan yang terjadi. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan berat badan pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

b. Metode Uji

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: kandang hewan, *sprit* injeksi, sonde oral, alat gelas, alat bedah steril, dan timbangan.
- b) Bahan: pakan tinggi lemak/karbohidrat atau bahan lainnya yang dapat membuat hewan uji mengalami obesitas, obat standar, dan sediaan uji.
- c) Hewan uji yang digunakan adalah hewan model yang secara genetik telah mengalami obesitas. Apabila tidak tersedia dapat menggunakan tikus jantan strain *Sprague-Dawley* atau *Wistar* yang dibuat obesitas.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor per kelompok. Hewan uji dikelompokkan sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar dan diberi pembawa sediaan uji yang bersifat inert sampai akhir pengujian.
- b) Kontrol negatif (hewan uji obesitas) diberi pakan tinggi lemak dan karbohidrat atau metode lain yang sesuai sampai terjadi obesitas hingga akhir pengujian serta diberi pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi berat badan.
- c) Kontrol positif (hewan uji obesitas) diberi pakan tinggi lemak dan karbohidrat atau metode lain yang sesuai sampai terjadi obesitas hingga akhir pengujian serta diberi obat standar, misalnya Orlistat (konversi dosis terapi manusia) yang dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.

- d) Kelompok perlakuan (hewan uji obesitas) diberi pakan tinggi lemak dan karbohidrat atau metode lain yang sesuai sampai terjadi obesitas hingga akhir pengujian serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis.

3) Induksi hewan uji

Induksi obesitas dapat dilakukan dengan salah satu cara berikut atau cara lain:

- a) Hewan uji dibuat obesitas dengan diberi pakan tinggi lemak dan/ atau karbohidrat atau bahan lainnya yang dapat membuat hewan uji mencapai indeks obesitas Lee $> 0,30$. Induksi obesitas dengan pakan tinggi lemak dan/atau karbohidrat atau bahan lainnya dilakukan hingga akhir pengujian.
- b) Hewan uji setelah lahir segera diberi perlakuan sub kutan harian dengan menginjeksikan 2-4 g/kg berat badan monosodium-L-glutamat selama 5 hari berurutan atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan. Tikus kontrol diberi perlakuan larutan garam fisiologis. Setelah berumur 3 minggu hewan disapih, dan dipelihara pada suhu ruang dengan siklus terang-gelap buatan, diberi pakan dan air ad libitum. Hewan ini dapat digunakan bila telah mencapai indeks obesitas Lee $> 0,30$ atau memiliki perbedaan berat badan 20% lebih besar dari hewan uji kontrol normal.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Hewan uji dianjurkan ditempatkan pada kandang individual 1 (satu) minggu sebelum pemberian sediaan uji. Hewan uji diberikan sediaan uji secara oral. Sediaan uji diberikan minimal selama 30 hari dan dapat diperpanjang sesuai dengan justifikasi ilmiah. Jumlah pakan yang dikonsumsi dihitung dari selisih jumlah pakan yang diberikan dikurangi sisa pakan.

5) Pengukuran parameter obesitas

Parameter obesitas yang diukur adalah berat badan dan konsistensi feses. Hewan uji ditimbang dua kali seminggu, diamati konsistensi feses. Di akhir masa pengujian hewan uji ditimbang, diukur panjang naso-anal (untuk menghitung indeks obesitas),

kemudian hewan uji dikorbankan dan diambil jaringan adiposa (adiposa total yang terdiri dari lemak visceral dan lemak subkutan) untuk menghitung indeks adiposa dengan rumus:

$$\text{Indeks Adiposa} = \frac{\text{Total lemak tubuh}}{\text{Berat badan akhir}} \times 100$$

Jika memungkinkan dianjurkan untuk melakukan pengamatan histopatologi lipid. Jaringan adiposa dimasukan ke dalam cairan *Backus-Naur Form* (BNF) 10% untuk keperluan pembuatan preparat histopatologi. Jaringan adiposa dipotong dengan ketebalan 5 μm , direkatkan pada gelas objek. Pewarnaan dilakukan menggunakan hematoksilin dan eosin. Parameter yang diamati adalah ukuran dari sel adiposit.

c. Evaluasi

Evaluasi dilakukan terhadap berat badan yang ditimbang dua kali seminggu, jumlah pakan yang dikonsumsi, indeks obesitas Lee, indeks adiposa dan ukuran sel adiposit (jika memungkinkan). Dilakukan analisis statistik untuk melihat homogenitas dan variasi antar kelompok, distribusi data kenaikan berat badan. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji (perubahan berat badan, indeks adiposa, ukuran sel adiposit, jumlah pakan yang dikonsumsi, dan indeks obesitas Lee) pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi klinik sebagai pertimbangan utama selain signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

D. ANTIHIPERURISEMIA

1. Patofisiologi Hiperurisemia

Asam urat merupakan produk akhir dari metabolisme purin pada manusia. Rodensia mempunyai enzim urikase sehingga asam urat akan diubah menjadi Allantoin (zat yang mudah larut dalam air dan diekskresikan melalui urin), sedangkan manusia tidak memiliki enzim urikase. Purin adalah protein yang termasuk dalam golongan

nukleo-protein, selain didapat dari pakan, purin juga berasal dari penghancuran sel-sel tubuh. Nukleosida utama dari purin adalah adenosin dan guanodin yang akan mengalami metabolisme menjadi xantin, antara lain oleh enzim xantin oksidase dan guanase. Xantin kemudian teroksidasi menjadi asam urat yang dikatalisis oleh enzim xantin oksidase (Gambar 13). Kadar normal asam urat pada tikus yaitu $1,39 \pm 0,07$ mg/dL.



Gambar 13. Gambaran Patofisiologi Peradangan pada Hiperurisemia

Apabila terjadi kelebihan produksi atau penurunan ekskresi asam urat atau keduanya maka akan terjadi peningkatan konsentrasi asam urat dalam darah yang disebut dengan hiperurisemia.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Jika tersedia hewan uji standar hiperurisemia maka digunakan hewan uji tersebut. Jika tidak tersedia, maka hewan uji dibuat hiperurisemia dengan diberi pakan yang mengandung purin tinggi dan dengan bahan kimia penghambat enzim urikase. Hewan uji dipastikan sudah mengalami hiperurisemia dan ditetapkan sebagai *baseline*.

Selanjutnya hewan uji diiberi sediaan uji sampai waktu yang ditentukan. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan penurunan kadar asam urat dalam darah pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

b. Metode Uji

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: Kandang hewan, kandang metabolisme (untuk penampung urin), spuit injeksi, sonde oral, peralatan gelas, mikropipet, tabung mikrosentrifus, timbangan, sentrifus dan spektrofotometer.
- b) Bahan: Pakan diet purin tinggi (misalnya jus hati ayam) dan bahan katalisator pembentuk asam urat (misalnya kalium oksonat 250 mg/kg berat badan mencit) yang dapat membuat hewan uji hiperurisemia, penghambat enzim urikase yaitu kalium oksonat, pembawa yang sesuai, pereaksi penetapan kadar asam urat, obat standar, dan sediaan uji.
- c) Hewan uji yang digunakan adalah hewan model yang secara genetik telah mengalami hiperurisemia. Apabila tidak tersedia dapat menggunakan tikus jantan strain *Sprague-Dawley* atau *Wistar* yang diinduksi hiperurisemia.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor per kelompok. Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar dan diberikan pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi kadar asam urat.
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji hiperurisemia) diberi pakan dengan kadar purin tinggi dan penghambat enzim urikase misalnya kalium oksonat dan pembawa sediaan uji sampai akhir pengujian.
- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji hiperurisemia) diberi pakan dengan kadar purin tinggi dan penghambat enzim

urikase misalnya kalium oksonat sampai akhir pengujian serta diberi obat standar misalnya allopurinol atau probenesid dengan konversi dosis terapi manusia. Obat standar tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.

- d) Kelompok perlakuan (hewan uji hiperurisemia) diberi pakan dengan kadar purin tinggi dan penghambat enzim urikase berupa kalium oksonat sampai akhir pengujian, serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis.

3) Induksi hewan uji

- a) Metode induksi urikostatik

Peningkatan kadar asam urat hewan uji (induksi hiperurisemia) dapat dilakukan dengan menggunakan antara lain cara berikut: Pemberian pakan tinggi kadar purin selama minimal 7 hari sampai didapatkan kadar asam urat tinggi yang stabil (minimal 2 kali kadar asam urat pada kelompok kontrol normal) yang digunakan sebagai baseline kadar asam urat. Untuk menjaga agar enzim urikase tidak aktif maka diberikan injeksi intraperitoneal kalium oksonat sesuai dosis pada uji pendahuluan di awal induksi sebelum pemberian pakan tinggi purin.

- b) Metode induksi urikosurik

Peningkatan kadar asam urat hewan uji (induksi hiperurisemia) dapat dilakukan dengan menggunakan antara lain cara berikut: Pemberian asam urat murni sesuai dosis pada uji pendahuluan sampai didapatkan kadar asam urat tinggi yang stabil (minimal 2 kali kadar asam urat pada kelompok kontrol normal) yang digunakan sebagai baseline kadar asam urat. Untuk menjaga agar enzim urikase tidak aktif maka diberikan injeksi intraperitoneal kalium oksonat di awal induksi sebelum pemberian asam urat murni.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Pengelompokan hewan uji dibuat sesuai prosedur diatas. Selama minimal 14 hari hewan uji pada kelompok kontrol positif diberi obat standar yaitu Allopurinol (untuk urikostatik) atau

probenesid (untuk urikosurik) dengan dosis sesuai konversi dosis terapi manusia, sedangkan kelompok uji diberi sediaan uji dengan dosis yang telah ditentukan. Darah dan/atau urin setiap hewan uji diambil pada hari ke-7 dan ke-14 untuk diperiksa kadar asam uratnya. Selama masa pengujian hewan uji ditimbang pada hari ke-7 dan hari ke-14.

5) Pengukuran parameter hiperurisemia

Parameter hiperurisemia yang diukur adalah kadar asam urat dalam serum dan/ atau urin dilakukan dengan metode penetapan kadar asam urat yang valid.

c. Evaluasi

Dilakukan pengukuran terhadap perubahan kadar asam urat darah dan/ atau urin setelah diberikan sediaan uji. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji yaitu kadar asam urat dalam serum dan/ atau urin pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan pada kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi klinik sebagai pertimbangan utama selain signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

E. ANTIHIPERGLIKEMIA

1. Patofisiologi Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit endokrin yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) yang menahun (kronik). Hiperglikemia timbul karena defisiensi insulin atau karena adanya resistensi insulin. Peningkatan tersebut dapat disertai gejala klinik, atau tidak ada gejala klinik sama sekali.

Glukosa adalah sumber energi utama bagi tubuh yang dapat diperoleh dari makanan, terutama yang mengandung karbohidrat. Apabila kadar glukosa dalam darah meningkat seperti setelah makan, maka sel-sel beta pankreas akan mengeluarkan hormon insulin. Sehingga glukosa darah dapat terserap ke dalam sel-sel tubuh yang nantinya dapat digunakan sebagai bahan bakar atau untuk menghasilkan zat lain yang diperlukan tubuh atau sekedar disimpan.

Sebaliknya, apabila kadar glukosa darah menurun, maka produksi insulin pun berkurang. Keadaan dimana sel-sel tubuh tidak responsif terhadap insulin, atau terdapat resistensi insulin, akan menyebabkan ketidakmampuan menyerap glukosa yang tersedia sehingga tidak dapat digunakan oleh sel tubuh.

Kadar glukosa darah normal mencit dan tikus beturut-turut adalah 62-175 mg/dL dan 50-135 mg/dL, sedangkan kadar glukosa darah pada mencit dan tikus diabetes adalah 200-350 mg/dL.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Jika tersedia hewan uji standar diabetes melitus sesuai tipenya maka digunakan hewan uji tersebut. Pengujian anti hiperglikemia pada hewan menggunakan model diabetes melitus tipe II. Hewan uji dibuat hiperglikemia dengan metode terbaik yang ada. Saat ini yang sering digunakan adalah menggunakan streptozotosin (STZ) dosis tertentu yang hanya akan merusak sebagian pankreas. Hewan uji yang telah dipastikan mengalami hiperglikemia ditetapkan sebagai *baseline*. Hewan uji kemudian diberi sediaan uji selama waktu tertentu dan diamati penurunan kadar glukosa darah. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan penurunan kadar glukosa darah pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

b. Metode Uji

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: Kandang hewan, spuit injeksi, sonde oral, peralatan gelas, tabung eppendorf, jarum suntik, mikropipet, sentrifus, timbangan dan spektrofotometer.
- b) Bahan: Bahan kimia yang dapat meningkatkan kadar glukosa darah hewan uji, obat standar, sediaan uji, pembawa yang sesuai, dan pereaksi penetapan kadar glukosa darah.
- c) Hewan uji yang digunakan adalah hewan model yang secara genetik telah mengalami diabetes melitus atau hewan uji normal yang diinduksi diabetes melitus. Hewan uji yang digunakan adalah tikus *Sprague-Dawley* atau *Wistar* jantan,

dewasa muda dan sehat.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor per kelompok. Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar dan diberi pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi kadar glukosa darah.
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji hiperglikemia) diberi pakan standar serta bahan kimia yang dapat meningkatkan kadar glukosa darah hewan uji dalam pembawa sediaan uji yang bersifat inert sampai akhir pengujian dan diberi pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi kadar glukosa darah.
- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji hiperglikemia) diberi pakan standar serta bahan kimia yang dapat meningkatkan kadar glukosa darah hewan uji dalam pembawa sediaan uji yang bersifat inert sampai akhir pengujian serta diberi obat standar (obat konvensional) penurun kadar glukosa darah dengan konversi dosis terapi manusia. Obat standar tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- d) Kelompok perlakuan (hewan uji hiperglikemia) diberi pakan standar serta bahan kimia yang dapat meningkatkan kadar glukosa darah hewan uji dalam pembawa sediaan uji yang bersifat inert sampai akhir pengujian serta diberi sediaan uji pada minimal tiga kelompok dosis.

3) Induksi hewan uji Diabetes Melitus Tipe II

Pada induksi hiperglikemia, peneliti disarankan untuk melakukan uji dalam penentuan dosis yang dapat meningkatkan kadar glukosa darah (200-350 mg/dL) pada hewan uji. Induksi hiperglikemia dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain sebagai berikut:

- a) Hewan uji dibuat hiperglikemia dengan memberikan Alloxan dosis rendah berdasarkan dosis orientasi pada uji pendahuluan induksi. Pada metode induksi ini, pembanding

obat standar yang disarankan yaitu kelompok Sulfonilurea misalnya glibenklamid.

b) Resistensi Insulin:

Hewan uji diberikan fruktosa ditambah pakan tinggi lemak masing-masing per oral 1 kali sehari selama 120 hari. Pada metode induksi ini, pembanding obat standar yang disarankan yaitu metformin.

Evaluasi uji resistensi insulin dapat ditetapkan melalui uji toleransi glukosa atau uji daya hipoglikemik glibenklamid atau dengan cara lain yang sesuai:

(1) Uji toleransi glukosa

Hewan uji dipuaskan 8-10 jam kemudian diukur kadar glukosa darahnya. Setelah itu diberi larutan glukosa 2 g/kg berat badan per oral. Pemberian sediaan uji diberikan 30 menit setelah pemberian larutan glukosa dan dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa pada menit ke-30, 60, 90 dan 120 setelah pemberian larutan glukosa. Kadar glukosa darah puasa dan *post loading* glukosa dibandingkan terhadap kontrol normal. Tikus dikatakan mengalami toleransi glukosa jika nilai AUC (*Area Under Curve*) kadar glukosa selama 120 menit pengukuran lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol normal. Tujuannya adalah untuk melihat apakah glukosa darah yang tinggi dapat kembali ke normal setelah 120 menit, apabila tidak dapat kembali ke normal maka terjadi resistensi insulin.

Uji toleransi glukosa dapat digunakan sebagai uji pendahuluan efektifitas sediaan uji dalam menurunkan kadar glukosa darah untuk dapat diteliti lebih lanjut.

(2) Uji daya hipoglikemik glibenklamid

Kondisi terjadinya resisten insulin pada hewan uji dikonfirmasi dengan melihat daya hipoglikemik glibenklamid (10 mg/kg berat badan per oral) yang diberikan pada

kelompok perlakuan. Kemudian dilakukan pengukuran kadar glukosa darah pada hewan uji. Dikatakan sudah mengalami DM tipe 2 yang resistensi insulin apabila presentase daya hipoglikemik kelompok resistensi insulin lebih rendah dibandingkan presentase daya hipoglikemik kelompok kontrol normal. Rumus untuk menghitung presentase daya hipoglikemik adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ Daya hipoglikemik Glibenklamid} = \frac{(a - b)}{(a - x)} \times 100\%$$

Keterangan :

a = kadar glukosa darah kelompok tanpa diberi glibenklamid

b = kadar glukosa darah kelompok yang diberi glibenklamid

x = kadar glukosa darah pada hari ke-0.

c) Defisiensi Insulin

Hewan uji dibuat defisiensi insulin dengan salah satu cara berikut:

1) Hewan uji dibuat hiperglikemia dengan memberikan streptozotosin (STZ)

Hewan uji diinjeksi STZ dalam rentang dosis 35-70 mg/kg berat badan tunggal atau pemberian berulang setelah 3 atau 7 hari dengan dosis yang sama atau 50%-nya jika pada dosis pertama belum mencapai hewan model hiperglikemia atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan yang dilarutkan segera dalam pelarut yang sesuai sebelum diinjeksikan dengan metode yang sesuai yang dapat ditambahkan pakan tinggi lemak. Pada saat pemberian berulang, pengecekan gula darah dilakukan pada hari ke-0, 7, 14, dan 21 untuk memastikan hewan model hiperglikemia. Jika pada hari ke-7 hewan model sudah terbentuk, maka sediaan uji dapat diberikan. Jika belum terbentuk, maka sediaan uji dapat diberikan setelah 7 hari induksi kedua. Hiperglikemia yang stabil pada hewan uji diperoleh setelah 10-14 hari perlakuan. Pada saat induksi dapat ditambahkan nikotinamida untuk mencegah kerusakan

pankreas yang parah. STZ pada hewan uji paling baik diberikan saat hewan puasa 4 jam untuk mencit dan 6-8 jam untuk tikus sebelum pemberian STZ. Namun minum masih tetap dapat diberikan.

Pada metode induksi ini, pembanding obat standar yang disarankan yaitu kelompok Sulfonilurea misalnya Glibenklamid.

- 2) Tikus diabetes akibat pemberian STZ pada masa neonatal.

Neonatal tikus galur *Sprague-Dawley* atau *Wistar* diinduksi dengan menggunakan larutan STZ dosis 90 mg/kg BB atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan yang diberikan secara intraperitoneal. STZ dilarutkan segera dalam dapar sitrat 0,1 M dengan pH 4,5 dingin sebelum diinjeksi. Induksi STZ hanya diberikan sekali pada usia 2 hari, kemudian setelah usia 4 minggu tikus disapih dan dipisahkan berdasarkan jenis kelamin. Keadaan diabetes tikus dilihat dengan mengukur kadar glukosa darah pada usia 12 minggu. Tikus dianggap hiperglikemi jika kadar glukosa darahnya lebih dari 1,5 kali kelompok normal (200-350 mg/dL).

Pada metode induksi ini, pembanding obat standar yang disarankan yaitu kelompok Sulfonilurea misalnya Glibenklamid.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Hewan uji pada kelompok perlakuan diberi sediaan uji dengan dosis yang telah ditentukan secara oral selama 14 hari atau lebih. Selama masa pengujian hewan uji ditimbang setiap hari.

5) Pengukuran parameter hiperglikemia

Parameter hiperglikemia yang diukur adalah kadar glukosa darah dengan metode penetapan kadar glukosa darah yang valid. Penetapan kadar glukosa darah dilakukan secara periodik.

c. Evaluasi

Dilakukan pengukuran terhadap penurunan kadar glukosa darah. Apabila diperlukan dapat dievaluasi terhadap parameter kadar insulin, kadar HbA1c, gambaran perubahan pada pankreas (histopatologi pankreas) dan jumlah sel beta. Dilakukan analisis statistik untuk melihat homogenitas dan variasi antar kelompok serta distribusi data kadar glukosa darah. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi klinik sebagai pertimbangan utama selain signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

F. ANTIDIARE NONSPESIFIK

1. Patofisiologi Diare Nonspesifik

Diare adalah keadaan buang air besar dengan konsistensi cair lebih dari 5 kali sehari, dapat merupakan gejala dari penyakit tertentu atau gangguan lain. Diare nonspesifik tidak disebabkan oleh penyakit yang berbahaya dan biasanya akan sembuh sendiri dalam 2 – 3 hari dengan memperhatikan asupan cairan untuk menghindari dehidrasi.

Pada diare terdapat gangguan resorpsi, sedangkan sekresi getah lambung- usus dan motilitas usus meningkat. Diare dapat disebabkan oleh meningkatnya peristaltik usus, sehingga pelintasan *chymus* (pakan yang sudah dicerna) sangat dipercepat dan masih mengandung banyak air pada saat meninggalkan tubuh sebagai feses. Penelitian pada tahun-tahun terakhir menunjukkan bahwa penyebab utamanya adalah karena bertumpuknya cairan di usus akibat gangguan resorpsi air dan/atau terjadinya hipersekresi. Pada keadaan normal proses resorpsi dan sekresi air dan elektrolit-elektrolit berlangsung pada waktu yang sama di sel-sel epitel mukosa.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Diare nonspesifik hewan uji dibuat dengan menggunakan minyak jarak (*Oleum ricini*) yang memiliki kandungan utama berupa asam risinoleat yang menghasilkan perubahan dalam absorpsi air dan

elektrolit sehingga menghasilkan respon hipersekresi. Selanjutnya diamati waktu terjadinya diare, jangka waktu berlangsungnya diare, konsistensi dan bobot feses.

Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

b. Metode Uji

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: Kandang hewan khusus individual lengkap dengan alas kertas saring, sonde oral, timbangan, dan peralatan gelas
- b) Bahan: Kertas saring, senyawa kimia yang dapat membuat hewan uji mengalami diare (minyak jarak), pembawa yang sesuai, obat standar, dan sediaan uji.
- c) Hewan uji yang digunakan adalah tikus atau mencit dewasa muda dan sehat.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor per kelompok. Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak membuat diare.
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji diare) diberi perlakuan induksi diare dan diberi pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak membuat diare.
- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji diare) diberi perlakuan induksi diare dan diberi obat standar pereda diare dengan konversi dosis terapi manusia. Obat kimia tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- d) Kelompok perlakuan (hewan uji diare) diberi perlakuan induksi diare dan diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis.

3) Induksi hewan uji dan prosedur pemberian sediaan uji

Hewan uji dipuasakan dari makan selama satu malam sebelum diberikan perlakuan. Pada pagi harinya hewan uji diberikan per oral sediaan uji yang akan dilihat aktivitas antidiarenya. Satu jam setelah pemberian sediaan uji, hewan uji diberikan 0,5-1 mL minyak jarak secara oral atau dosis berdasarkan hasil optimasi dosis minyak jarak yang diberikan melalui uji pendahuluan.

4) Pengukuran parameter diare

Parameter diare yang diukur adalah feses hewan uji yang meliputi berat feses, konsistensi feses, dan frekuensi defekasi. Feses hewan uji ditampung dengan alas kertas saring selama 8 jam setelah pemberian minyak jarak. Setiap 15 menit selama 4 jam pertama kertas saring diambil dan ditimbang fesesnya sehingga didapat berat feses bersih, disebut ekskresi diare awal. Kemudian kertas saring baru diletakkan untuk menampung feses 1 jam berikutnya sampai 8 jam. Periode bebas diare didefinisikan sebagai waktu (menit) antara pemberian minyak jarak dan terjadinya diare pertama. Fase diare akut adalah waktu (menit) antara diare pertama dan diare terakhir dari periode pengamatan 8 jam. Selain menimbang berat feses diamati juga konsistensi feses dari hewan uji, apakah berbentuk cair, lunak, atau padat (feses normal). Frekuensi diare dicatat dalam waktu 8 jam.

c. Evaluasi

Dilakukan pengukuran terhadap perubahan parameter feses hewan uji yang meliputi berat feses, konsistensi feses, dan frekuensi defekasi. Dilakukan analisis statistik untuk melihat homogenitas dan variasi antar kelompok. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi klinik sebagai pertimbangan utama selain signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

G. ANTIINFLAMASI

1. Patofisiologi Inflamasi

Inflamasi atau radang adalah reaksi yang menyebabkan terlepasnya mediator-mediator inflamasi sehingga timbul respon vaskular dan migrasi makrofag sehingga menyebabkan penimbunan cairan di lokasi radang. Mediator-mediator inflamasi tersebut antara lain sitokin, histamin, kinin, dan prostaglandin. Histamin menyebabkan dilatasi arteriol dan meningkatkan permeabilitas kapiler, sehingga cairan dapat meninggalkan kapiler. Kinin juga meningkatkan permeabilitas kapiler dan menimbulkan rasa nyeri. Prostaglandin juga menyebabkan vasodilatasi, permeabilitas kapiler meningkat, menimbulkan rasa nyeri dan demam. Proses inflamasi merupakan suatu mekanisme perlindungan tubuh untuk menetralkan agen yang berbahaya serta untuk pemulihan jaringan.

Inflamasi dibagi menjadi inflamasi akut dan kronis. Pada inflamasi akut terjadi kontraksi arteriol diikuti vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskular, eksudasi cairan protein dan plasma, dan migrasi makrofag ke dalam jaringan yang terluka. Vasodilatasi menimbulkan *kalor* (panas) dan *rubor* (kemerahan), sedangkan eksudasi dan infiltrasi makrofag menimbulkan *tumor* (bengkak), *dolor* (nyeri) dan *functio laesa* (hilangnya fungsi) berhubungan dengan meningkatnya tekanan pada saraf sebagai hasil adanya edema jaringan. Inflamasi kronis dapat dimulai 2-4 hari setelah timbulnya respon akut dan dapat bertahan selama seminggu atau sebulan yang ditandai dengan pembentukan granuloma. Metodologi pengujian dalam pedoman ini difokuskan pada uji inflamasi akut.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Hewan uji dibuat inflamasi dengan memberikan bahan induksi inflamasi (misalnya *croton oil*, karagenan dan asam arakhidonat), kemudian diberikan sediaan uji dalam waktu tertentu dan diamati volume edema yang terjadi. Pemberian sediaan uji dapat diberikan sebelum atau bersamaan dengan pemberian bahan induksi inflamasi dan diamati volume edema yang terjadi.

Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan

perbedaan volume edema pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

b. Metode Uji Inflamasi Telinga

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: Kandang hewan, spuit injeksi, alat gelas, timbangan, dan cakram telinga (ear tagger).
- b) Bahan: Pakan hewan, Induktor (*croton oil*), etanol, piridin, etil eter, sediaan uji, obat standar, pembawa.
- c) Hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan strain *Sprague-Dawley* atau *Wistar* atau mencit jantan (*Mus musculus*) dewasa muda dan sehat.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol negatif
 - Telinga kiri hewan uji tidak diberi perlakuan.
 - Telinga kanan hewan uji diberi bahan pemicu inflamasi (larutan iritan *croton oil*).
- b) Kelompok kontrol positif
 - Telinga kiri hewan uji tidak diberi perlakuan.
 - Telinga kanan hewan uji diberi obat standar pereda inflamasi dengan konversi dosis terapi manusia yang dilarutkan dalam larutan pemicu inflamasi (larutan iritan *croton oil*).
- c) Kelompok Perlakuan
 - Telinga kiri hewan uji tidak diberi perlakuan.
 - Telinga kanan hewan uji diberi sediaan uji yang dilarutkan dalam larutan pemicu inflamasi (larutan iritan *croton oil*) pada minimal tiga kelompok dosis.

3) Induksi hewan uji

Inflamasi pada telinga mencit/tikus. Hewan uji dapat dianestesi sebelum diberikannya larutan pemicu inflamasi (larutan iritan *croton oil*).

- a) Untuk mencit digunakan larutan iritan yang terdiri dari (v/v):

1 bagian *croton oil*, 10 bagian etanol, 20 bagian piridin, 69 bagian etil eter atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan.

- b) Untuk tikus digunakan larutan iritan sebagai berikut (v/v): 4 bagian *croton oil*, 10 bagian etanol, 20 bagian piridin, 66 bagian etil eter atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan.

Hewan uji dibuat inflamasi dengan cara dioleskan larutan iritan pada telinga sebelah kanan di kedua sisinya (dalam dan luar) sejumlah 0,02 mL untuk tikus dan 0,01 mL untuk mencit.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Telinga kiri masing-masing hewan uji dijadikan sebagai kontrol negatif (tidak diberi perlakuan). Pengujian dilakukan satu kali dan pengamatan dilakukan selama 24 jam. Sediaan uji dilarutkan pada larutan iritan *croton oil* dengan konsentrasi 0,03-1 mg/mL untuk mencit dan untuk tikus dengan konsentrasi 0,1- 10 mg/mL. Pada kontrol positif diberikan obat standar yang dilarutkan dalam bahan pemicu inflamasi (larutan iritan *croton oil*). Pengukuran edema dapat juga dilakukan dengan mengukur tebal daerah inflamasi menggunakan mikrometer sekrup.

5) Pengukuran parameter inflamasi

Dilakukan pengukuran terhadap penurunan edema setelah diberikan sediaan uji dan dibandingkan dengan kondisi edema pada kelompok kontrol negatif. Dilakukan analisis statistik untuk melihat homogenitas dan variasi antar kelompok, distribusi data edema, dan signifikansi penurunan edema. Persentase peningkatan edema telinga dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Edema Telinga} = \frac{\text{Tebal telinga kanan} - \text{Tebal telinga kiri}}{\text{Tebal telinga kiri}} \times 100\%$$

c. Metode Uji Inflamasi Telapak Kaki Tikus

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: Kandang hewan, timbangan, spuit injeksi, sonde oral, pletismometer dan peralatan gelas.

- b) Bahan: Larutan iritan karagenan 0,5-2%, kontrol positif (misalnya diclofenak atau Ibuprofen), obat standar, sediaan uji dan pembawa.
- c) Hewan uji tikus jantan strain *Sprague-Dawley* atau *Wistar* dewasa muda dan sehat.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor per kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol negatif (hewan uji inflamasi) diberikan bahan kimia yang dapat membuat hewan uji mengalami inflamasi (karagenan 0,5-2%).
- b) Kelompok kontrol positif (hewan uji inflamasi) diberi obat standar pereda inflamasi dengan konversi dosis terapi manusia. Selanjutnya diberikan bahan kimia yang dapat membuat hewan uji mengalami inflamasi (karagenan 0,5-2%).
- c) Kelompok perlakuan (hewan uji inflamasi) diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis. Selanjutnya diberikan bahan kimia yang dapat membuat hewan uji mengalami inflamasi (karagenan 0,5-2%).

3) Prosedur pemberian sediaan uji

Sebelum pemberian larutan per oral hewan uji dipuaskan selama 8-10 jam kemudian volume kaki hewan uji diukur (V₀), kemudian larutan per oral diberikan. Pemberian sediaan uji dilakukan per oral sesuai hasil optimasi waktu pemberian.

4) Induksi hewan uji

Tiga puluh menit setelah pemberian larutan per oral (larutan pembawa/ sediaan uji/ obat standar) hewan uji diinduksi. Induksi inflamasi pada kaki tikus dilakukan dengan cara diinjeksi dengan 0,05 mL - 0,1 mL larutan karagenan 0,5-2% atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan, secara intraplantar pada telapak kaki kiri hewan uji. Kaki kanan digunakan sebagai kontrol normal.

5) Pengukuran parameter edema kaki tikus

Peningkatan volume kaki diukur dengan alat pletismometer atau alat lain yang dirancang menurut hukum *Archimedes*. Kaki tikus ditandai sebagai batas pencelupan pada pletismometer. Edema pada telapak kaki diukur setiap 30 menit selama 3 jam pertama dan setiap jam selama 3 jam kedua setelah injeksi karagenan (V_t).

d. Evaluasi

Data yang diperoleh berupa kurva volume edema kaki hewan uji. Volume edema merupakan selisih edema kaki hewan uji sebelum dan sesudah diinduksi, dengan rumus:

$$V_e = V_t - V_0$$

Keterangan:

V_e = Volume edema kaki tikus

V_t = Volume kaki hewan uji setelah diinduksi karagenan

V_0 = Volume awal kaki hewan uji sebelum diinduksi karagenan

Perhitungan persen inhibisi dengan rumus:

$$\text{Persen Inhibisi} = \frac{\Delta V_{kt} - \Delta V_t}{\Delta V_{kt}} \times 100\%$$

Keterangan:

$$\Delta V_{kt} = V_{kt} - V_0$$

$$\Delta V_t = V_t - V_0$$

V_t = Volume kaki kelompok sediaan uji pada waktu t

V_{kt} = Volume kaki kelompok kontrol negatif pada waktu t

V_0 = Volume kaki awal sebelum induksi

ΔV_t = Volume edema kaki kelompok sediaan uji

ΔV_{kt} = Volume edema kaki kelompok kontrol negatif

Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi klinik sebagai pertimbangan utama disamping signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

H. PEREDA BATUK

1. Patofisiologi Batuk

Batuk merupakan mekanisme pertahanan tubuh terhadap benda asing atau iritasi di saluran nafas, misalnya karena adanya mukus, makanan, debu, dan asap. Batuk merupakan refleks yang dikendalikan oleh pusat batuk di otak. Frekuensi batuk yang terlalu tinggi dapat mempengaruhi kualitas hidup seseorang.

Suatu rangsangan mekanik ataupun kimia pada reseptor (berupa saraf non myelin halus yang terletak di dalam ataupun di luar rongga toraks) dapat memicu terjadinya batuk. Rangsangan mekanik atau kimia tersebut dibawa ke pusat batuk yang terletak di otak. Pada dasarnya mekanisme batuk dapat dibagi menjadi empat fase yaitu:

a. Fase iritasi

Iritasi dari salah satu saraf sensorik *nervus vagus* di saluran nafas dapat menimbulkan batuk.

b. Fase inspirasi

Pada fase inspirasi glotis secara refleks terbuka lebar akibat kontraksi otot abduktor kartilago aritenoidea. Inspirasi terjadi secara dalam dan cepat, sehingga udara dengan cepat dan dalam jumlah banyak masuk ke dalam paru. Hal ini disertai tergerakannya iga bawah akibat kontraksi otot toraks, perut dan diafragma, sehingga dimensi lateral dada membesar mengakibatkan peningkatan volume paru. Masuknya udara ke dalam paru dengan jumlah banyak memberikan keuntungan yaitu akan memperkuat fase ekspirasi sehingga lebih cepat dan kuat serta memperkecil rongga udara yang tertutup sehingga menghasilkan mekanisme pembersihan yang potensial.

c. Fase kompresi

Fase ini dimulai dengan tertutupnya glotis akibat kontraksi otot adduktor kartilago aritenoidea, glotis tertutup selama 0,2 detik. Pada fase ini tekanan intratoraks meningkat hingga terjadi batuk yang efektif. Tekanan pleura tetap meninggi selama 0,5 detik setelah glotis terbuka. Batuk dapat terjadi tanpa penutupan glotis karena otot-otot ekspirasi mampu meningkatkan tekanan intratoraks walaupun glotis tetap

terbuka.

d. Fase ekspirasi

Pada fase ini glotis terbuka secara tiba-tiba akibat kontraksi aktif otot ekspirasi, sehingga terjadilah pengeluaran udara dalam jumlah besar dengan kecepatan yang tinggi disertai dengan pengeluaran benda-benda asing, gerakan glotis otot-otot pernafasan dan cabang-cabang bronkus merupakan hal yang penting dalam fase mekanisme batuk dan disinilah terjadi fase batuk yang sebenarnya. Suara batuk sangat bervariasi akibat getaran sekret yang ada dalam saluran nafas atau getaran pita suara.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Pada metode uji antitusif, hewan uji diinduksi dengan dipaparkan agen yang membuat batuk, dipastikan hewan uji mengalami batuk lalu dicatat jumlah batuk sebagai *baseline*, kemudian diberikan sediaan uji dosis tunggal dan diamati pengurangan jumlah batuk pada rentang waktu tertentu. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perbedaan jumlah batuk sebelum dan sesudah pemberian sediaan uji. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan penurunan frekuensi batuk pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

Pada metode uji ekspektoran, hewan uji tidak dilakukan induksi apapun. Hewan uji diberi *phenol red* untuk mewarnai trakea. Dilakukan pengukuran densitas optikal yang menggambarkan kemampuan sediaan uji untuk meningkatkan sekresi mukus. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan efek ekspektoran pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

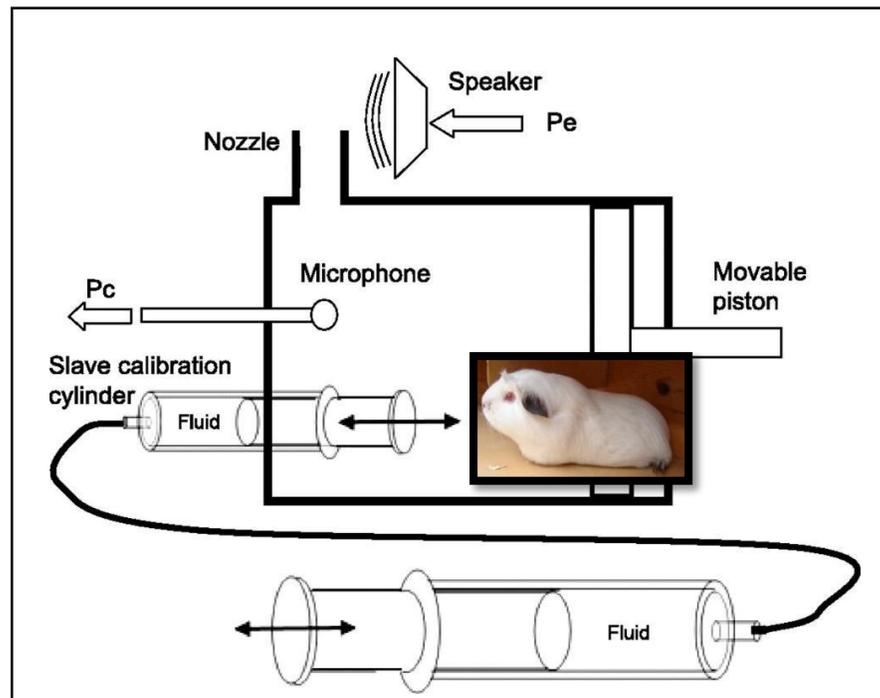
b. Metode Uji Antitusif

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: kandang hewan, *sputum injeksi*, sonde oral, alat gelas, alat bedah steril, timbangan, alat pendeteksi perubahan

tekanan udara, kanula peroral, *compressor nebulizer*, wadah perlakuan antitusif seperti *master calibration cylinder*.

- b) Bahan: asam sitrat, air, pakan standar, obat standar, dan sediaan uji.
- c) Hewan uji dapat menggunakan rodensia seperti marmut albino jantan strain *Dunkin-Hartley* dengan bobot 300 – 400 g, tikus dan mencit.



Gambar 14. *Master calibration cylinder* untuk rodensia (sumber: Daubenspeck *et al.*, 2008)

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor per kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi bahan pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi frekuensi batuk.
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji batuk) dipaparkan dengan bahan kimia yang dapat menimbulkan batuk (misalnya asam sitrat) dalam bahan pembawa yang bersifat inert sampai akhir pengujian, kemudian diberi bahan pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi kondisi hewan uji.
- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji batuk) diberi bahan kimia yang dapat menimbulkan batuk (misalnya asam sitrat) dalam

bahan pembawa yang bersifat inert sampai akhir pengujian serta diberi obat standar pereda batuk dengan konversi dari dosis terapi manusia. Obat standar tersebut dilarutkan dalam bahan pembawa yang sama dengan sediaan uji.

- d) Kelompok perlakuan (hewan uji batuk) diberi bahan kimia yang dapat menimbulkan batuk (misalnya asam sitrat) dalam bahan pembawa yang bersifat inert sampai akhir pengujian, kemudian diberikan sediaan uji pada minimal tiga kelompok dosis.

3) Induksi hewan uji dan prosedur pemberian sediaan uji

Hewan uji diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari sebelum diberi perlakuan. Hewan uji ditempatkan dalam wadah kaca silinder, dengan 2 tabung di kedua ujungnya. Salah satu ujungnya berfungsi sebagai pintu masuk aerosol iritan, dan ujung lainnya untuk mengeluarkan aerosol iritan. Ujung tabung yang mengeluarkan aerosol iritan dilengkapi dengan alat pendeteksi perubahan tekanan udara, yang memungkinkan pengaturan sistem sensitivitas, sehingga respirasi normal tidak tercatat, tetapi perpindahan udara akibat batuk hewan uji dapat tercatat seperti contoh pada Gambar 14. Untuk melihat respon batuk, hewan uji diberi aerosol iritan selama 10 menit berupa asam sitrat 7,5% dalam air atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan, kemudian dicatat jumlah batuk selama 15 menit sebagai *baseline* (A). Hewan uji yang akan digunakan adalah hewan dengan frekuensi batuk antara 25-30 kali /15 menit. Hewan uji dikeluarkan dari wadah kaca silinder dan diistirahatkan selama satu jam, kemudian diberi sediaan uji/ obat standar/ pembawa secara oral. Setelah 30 menit, hewan uji dimasukkan ke wadah kaca silinder dan diberi aerosol iritan kembali selama 10 menit dan dicatat jumlah batuk (B) selama 15 menit. Perlakuan induksi batuk dan pemberian sediaan uji dilakukan satu kali (dosis tunggal).

4) Pengukuran parameter batuk

Nilai rata – rata persentase penekanan batuk (PPB) dihitung dengan cara:

$$\% \text{ PPB} = 1 - (B/A) \times 100\%$$

Keterangan:

A : Frekuensi batuk baseline

B : Frekuensi batuk setelah pemberian sediaan uji

c. Metode Uji Ekspektoran

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: kandang hewan, spuit injeksi, sonde oral, alat gelas, alat bedah steril, dan timbangan.
- b) Bahan: *phenol red*, air, obat standar, dan sediaan uji.
- c) Hewan uji menggunakan tikus atau mencit.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor per kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol negatif diberi bahan pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi mukus. Hewan uji diberi *phenol red* untuk mewarnai trakea.
- b) Kelompok kontrol positif diberi bahan obat standar ekspektoran dengan konversi dari dosis terapi manusia. Obat standar tersebut dilarutkan dalam bahan pembawa yang sama dengan sediaan uji. Hewan uji diberi *phenol red* untuk mewarnai trakea.
- c) Kelompok perlakuan diberi sediaan uji pada minimal tiga kelompok dosis. Hewan uji diberi *phenol red* untuk mewarnai trakea.

3) Induksi hewan uji dan prosedur pemberian sediaan uji

Hewan uji tidak dilakukan induksi apapun. Hewan uji diberi *phenol red* untuk mewarnai trakea pada 30 menit setelah pemberian sediaan uji/ obat standar/ pembawa secara oral. Hewan uji diberi larutan *phenol red* 2,5-5% 0,2 mL atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan secara intraperitoneal. Setelah 30 menit, hewan uji dinekropsi dengan dislokasi leher, lalu dibedah, diambil trakea dari kartilago tiroid hingga batang utama bronchi dan segera dimasukkan dalam normal saline 1 mL dan dicuci selama 30 menit.

4) Pengukuran parameter ekspektoran

Setelah trakea dicuci, larutan disonikasi selama 15 menit, lalu ditambahkan 0,1 mL larutan NaHCO₃ atau NaOH dalam larutan saline, diukur densitas optikal yang menggambarkan kadar *phenol red* pada *microplate reader* panjang gelombang 546 nm atau menggunakan metode yang sesuai dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Ekspektoran} = \frac{\text{Densitas Optikal Perlakuan} - \text{Densitas Optikal Kontrol Negatif}}{\text{Densitas Optikal Kontrol Negatif}} \times 100\%$$

Data yang dihasilkan menggambarkan kemampuan sediaan uji untuk meningkatkan sekresi mukus ke trakea.

d. Evaluasi

Evaluasi dilakukan terhadap frekuensi batuk setelah dan sebelum pemberian sediaan uji untuk uji antitusif serta efek ekspektoran untuk uji ekspektoran. Dilakukan analisis statistik untuk melihat homogenitas dan variasi antar kelompok. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan penurunan jumlah batuk untuk efek antitusif dan efek ekspektoran untuk uji ekspektoran. Analisa statistik dilakukan untuk kelompok uji dibandingkan kontrol negatif, menggunakan uji statistik yang sesuai. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

I. PEREDA NYERI

1. Patofisiologi Nyeri

Nyeri adalah mekanisme perlindungan yang dipicu pada stimulasi *nociceptors* dari adanya bahaya (reseptor nyeri) terhadap kesadaran adanya kerusakan jaringan yang sedang atau akan terjadi. Rasa nyeri baik akut maupun kronis merupakan masalah kesehatan yang signifikan meskipun mekanisme dasarnya sangat rumit untuk dipelajari. Banyak penyakit klinis disertai dengan gejala nyeri dan derajat nyeri tersebut terkait erat dengan rasa sakit yang dialami pasien. Rasa nyeri merupakan pengalaman yang kompleks dan unik

yang merupakan respon fisiologis dan memiliki komponen psikologik. Melibatkan beberapa jalur termasuk *nociceptive signal regeneration* (transduction) dan *propagation* (transmission) serta persepsi dan modulasi rangsangan *nociceptive*. Rasa nyeri disebabkan karena pembebasan senyawa-senyawa kimia tertentu oleh stimulus nyeri, seperti bradikinin yang menimbulkan nyeri akibat eksitasi ujung-ujung saraf nyeri. Nilai ambang intensitas stimulus untuk nyeri relatif konstan pada orang yang normal namun rasa nyeri sebagai respon terhadap stimulus nyeri dapat bervariasi antara setiap individu. Oleh karena itu, pereda nyeri telah menjadi salah satu yang vital dalam pengobatan klinis dan banyak penelitian untuk menemukan pereda nyeri tersebut. Pereda nyeri digolongkan ke dalam dua kelompok besar yaitu obat golongan opioid yang bekerja di sistem saraf pusat untuk nyeri sedang sampai berat dan golongan non-opioid untuk nyeri ringan sampai sedang seperti parasetamol dan golongan *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs* (NSAIDs) yang bekerja di reseptor saraf perifer.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Hewan uji diinduksi dengan bahan kimia yang dapat menyebabkan nyeri seperti asam asetat, fenilkuinon dan bradikinin. Hewan uji dipilih yang memiliki sensitifitas nyeri yang tinggi. Selanjutnya hewan uji diberi sediaan uji sampai waktu yang ditentukan dan diinduksi nyeri. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan jumlah geliat pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

b. Metode Uji

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: Kandang hewan, *sputit* injeksi, sonde oral, peralatan gelas, dan timbangan.
- b) Bahan: asam asetat, obat standar, dan sediaan uji.
- c) Hewan uji yang digunakan adalah menggunakan mencit jantan yang diinduksi mengalami nyeri.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor per kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar dan diberikan pembawa sediaan uji yang bersifat inert.
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji yang mengalami nyeri) diberi pakan standar dan induksi bahan kimia yang menyebabkan nyeri serta pembawa sediaan uji sampai akhir pengujian.
- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji yang mengalami nyeri) diberi pakan standar dan induksi bahan kimia yang menyebabkan nyeri serta diberi obat standar misalnya Parasetamol, Natrium Diklofenak, Asetosal dengan konversi dosis terapi manusia. Obat standar tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- d) Kelompok perlakuan (hewan uji yang mengalami nyeri) diberi pakan standar dan induksi bahan kimia yang menyebabkan nyeri serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis.

3) Prosedur pemberian sediaan uji

Pengelompokan hewan uji dibuat sesuai prosedur diatas. Sebelum pemberian larutan per oral hewan uji dipuaskan terlebih dahulu. Pemberian sediaan uji dilakukan per oral sesuai dengan pengelompokan hewan uji sebelum dilakukan induksi hewan uji.

4) Induksi hewan uji

Tiga puluh menit setelah pemberian larutan per oral (larutan pembawa/ sediaan uji/ obat standar) hewan uji diinduksi. Hewan uji mengalami nyeri yang dapat dilakukan dengan menggunakan antara lain cara berikut: Pemberian induksi bahan kimia misalnya asam asetat 0,5-3% dengan volume 0,2 mL secara intraperitoneal sehingga didapatkan hewan uji yang mengalami nyeri atau berdasarkan hasil optimasi dosis asam asetat yang diberikan melalui uji pendahuluan. Sebelumnya dilakukan uji pendahuluan geliat pada mencit setelah pemberian asam asetat untuk melihat

sensitifitas mencit pada tahap seleksi hewan uji. Hanya hewan uji yang sensitif yang digunakan pada penelitian. Hewan uji yang sensitif ditandai dengan terjadinya geliat.

5) Pengukuran parameter nyeri

Pengukuran parameter daya analgesik dilakukan dengan metode *Siegmund*. Setelah induksi dengan asam asetat, mencit akan memberikan respon geliat yang ditunjukkan dengan menggerakkan sepasang kaki depan yang ditarik ke depan dan sepasang kaki belakang yang ditarik ke belakang serta menekan perut ke dasar kandang/ lantai.

Dilakukan pengamatan jumlah geliat mencit dalam rentang waktu 5-10 menit selama 1 jam (pada menit ke-5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60).

c. Evaluasi

Dievaluasi profil jumlah geliat mencit terhadap waktu. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi klinik sebagai pertimbangan utama disamping signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

J. PEREDA DEMAM

1. Patofisiologi Demam

Demam didefinisikan sebagai peningkatan suhu tubuh diatas normal. Pada dewasa, suhu tubuh normal adalah 37°C (98,6°F) tetapi dapat bervariasi pada tiap individu hingga 1°C. Respon demam merupakan sebuah reaksi fisiologis kompleks akibat penyakit yang melibatkan peningkatan suhu tubuh yang dimediasi sitokin. Temperatur tubuh tergantung pada penjagaan keseimbangan antara produksi dan pelepasan panas. Hipotalamus bertanggung jawab sebagai pusat pengatur suhu tubuh, berfungsi sebagai thermostat yang mengontrol keseimbangan produksi dan pelepasan panas. Pirogen eksogenus antara lain lipopolisakarida (LPS), toksin,

superantigen, peptidoglikan akan menginduksi produksi sitokin pro-inflamasi seperti interleukin 1β (IL- 1β) dan 6 (IL-6), interferon (INF- α) dan Tumor Necrosis Factor (TNF) yang akan masuk ke dalam sirkulasi hipotalamik dan menstimulasi pelepasan prostaglandin lokal dan mengubah *setpoint termal hipotalamus*. Prostaglandin akan mengaktivasi neuron *thermoregulator* pada area anterior hipotalamus (area untuk meningkatkan temperatur tubuh). (Dalal & Zhukovsky, 2006) Pada umumnya obat antipiretik bekerja dengan cara menghambat enzim siklooksigenase dan menurunkan jumlah Prostaglandin E2 (PGE2) didalam hipotalamus.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Hewan uji diinduksi dengan senyawa penginduksi demam seperti LPS, pepton, ragi atau senyawa lain yang sesuai. Hewan uji dipastikan telah mengalami demam, dengan peningkatan suhu minimal 1°C . Hewan uji yang digunakan memiliki variasi peningkatan suhu tubuh tidak lebih dari $0,5^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya diberikan sediaan uji untuk membandingkan perbedaan penurunan temperatur tubuh pada kelompok uji dengan kelompok kontrol menggunakan uji statistik yang sesuai. Kelompok kontrol positif yang digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

b. Metode Uji

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: Kandang hewan, spuit injeksi, sonde oral, peralatan gelas, mikropipet, timbangan, dan termometer rektal hewan
- b) Bahan: LPS, pepton, Suspensi Ragi Bir (*Brewer's Yeast*), obat standar (misalnya Parasetamol), akuades, dan sediaan uji
- c) Hewan uji yang digunakan dapat berupa tikus atau kelinci yang diinduksi dengan senyawa tertentu.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor per kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi akuades

- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji demam) diberi akuades dan induksi bahan kimia yang menyebabkan demam.
- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji demam) diberi akuades dan induksi bahan kimia yang menyebabkan demam serta diberi obat standar seperti parasetamol atau antipiretik lainnya yang sesuai dengan konversi dosis terapi manusia. Obat standar tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- d) Kelompok perlakuan (hewan uji demam) diberi akuades dan induksi bahan kimia yang menyebabkan demam serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis.

3) Induksi hewan uji

- a) Induksi dengan menggunakan LPS dari bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli*, dengan dosis 0,1-0,3 µg/kg atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan secara intravena melalui pembuluh darah marginal telinga kelinci yang dilatasi dengan *xylene*. Peningkatan suhu tubuh minimal 1°C. Hewan uji yang digunakan memiliki variasi peningkatan suhu tubuh tidak lebih 0,5°C. Pemberian sediaan uji dilakukan setelah terjadinya demam.
- b) Induksi dengan menggunakan suspensi pepton 5% atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan secara subkutan pada bagian belakang bawah tengkuk leher. Setelah injeksi hewan diukur suhu rektalnya setiap 30 menit sampai mencapai peningkatan suhu tubuh minimal 1°C. Hewan uji yang digunakan memiliki variasi peningkatan suhu tubuh tidak lebih 0,5°C. Pemberian sediaan uji dilakukan setelah terjadinya demam.
- c) Induksi dengan menggunakan suspensi Ragi Bir (*Brewer's Yeast*) dengan dosis 10 mL/kg berat badan yang sebelumnya telah diinkubasi pada suhu 37°C (Suspensi ragi 15 % pada larutan salin) atau dosis sesuai orientasi pada uji pendahuluan, secara subkutan pada bagian belakang bawah tengkuk leher. Setelah injeksi, bagian yang diinjeksi dipijat untuk menyebarkan suspensi di kulit. Setelah injeksi hewan dipuaskan, suhu ruangan dijaga pada 22-25°C. Setelah 18

jam, kenaikan suhu di rektal diukur. Pengukuran diulang setelah 30 menit. Peningkatan suhu tubuh minimal 1°C . Hewan uji yang digunakan memiliki variasi peningkatan suhu tubuh tidak lebih dari $0,5^{\circ}\text{C}$. Pemberian sediaan uji dilakukan setelah terjadinya demam.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Pengelompokan hewan uji dibuat seperti diatas. Hewan yang telah mengalami demam diberikan sediaan uji minimal 3 (tiga) kelompok dosis.

5) Pengukuran parameter demam

Suhu rektal diukur setiap 30 menit selama 3 jam pertama dan setiap 1 jam pada 3 jam kedua. Penurunan suhu dianggap bermakna apabila menghasilkan penurunan demam minimal $0,5^{\circ}\text{C}$.

c. Evaluasi

Dilakukan pengukuran terhadap perubahan suhu tubuh hewan uji. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji yaitu suhu tubuh pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan pada kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi klinik sebagai pertimbangan utama selain signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan.

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

ttd.

PENNY K. LUKITO