



BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN

**PERATURAN BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
NOMOR 20 TAHUN 2023
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 diterapkan dalam pengembangan obat tradisional melalui pembuktian khasiat secara ilmiah sebelum beredar untuk memenuhi persyaratan keamanan, khasiat, dan mutu guna meningkatkan daya saing serta mendukung percepatan pengembangan industri farmasi khususnya industri obat tradisional;
- b. 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;
- c. bahwa pengaturan mengenai pedoman uji farmakodinamik praklinik obat tradisional sebagaimana telah diatur dalam Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 18 Tahun 2021 tentang Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional, sudah tidak sesuai dengan kebutuhan hukum serta perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang Obat Tradisional sehingga perlu diganti;
- 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) sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 13 Tahun 2022 tentang Perubahan atas 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 2022 Nomor 629);

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.

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

Permohonan persetujuan pelaksanaan uji praklinik dengan Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional yang diajukan sebelum berlakunya Peraturan Badan ini, tetap diproses berdasarkan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 18 Tahun 2021 tentang Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2021 Nomor 788).

Pasal 5

Pada saat Peraturan Badan ini mulai berlaku, Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 18 Tahun 2021 tentang Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2021 Nomor 788), dicabut dan dinyatakan tidak berlaku.

Pasal 6

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 9 Agustus 2023

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

ttd.

PENNY K. LUKITO

Diundangkan di Jakarta
pada tanggal 9 Agustus 2023

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

ttd.

ASEP N. MULYANA

BERITA NEGARA REPUBLIK INDONESIA TAHUN 2023 NOMOR 615

Salinan Sesuai Dengan Aslinya
BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
Kepala Biro Hukum dan Organisasi,


Reghi Perdana

LAMPIRAN
PERATURAN BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
NOMOR 20 TAHUN 2023
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 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 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.

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 yang dapat mendeteksi, mencegah dan mengawasi produk obat dan makanan dalam melindungi keselamatan konsumen. Sistem tersebut meliputi pengawasan prapemasaran (*premarket*) dan pascapemasaran (*postmarket*) termasuk Obat Tradisional, sehingga 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 masyarakat.

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 yang kompeten sesuai dengan prinsip-prinsip *Good Laboratory Practice* (GLP) serta menerapkan prinsip etik penelitian hewan laboratorium yaitu 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, antihiperglikemia, antidiare nonspesifik, antiinflamasi, pereda batuk, pereda nyeri, pereda demam, imunostimulan, antitukak lambung, pelancar Air Susu Ibu (ASI), memperbaiki gangguan hati, dan perbaikan status gizi. Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional sesuai kelas terapi pada pedoman ini dilakukan sebagai data dukung klaim khasiat produk. Kelas terapi yang tercantum bukan merupakan klaim khasiat produk. Klaim khasiat akan dievaluasi berdasarkan hasil yang diperoleh dan dievaluasi lebih lanjut sesuai dengan ketentuan perundang-undangan.

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 di Indonesia dalam melaksanakan kegiatan penelitian, pengembangan, pengkajian, penerapan, dan invensi serta inovasi di bidang Obat Tradisional.

BAB II PEDOMAN UMUM

A. Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*)

Pada setiap uji yang menggunakan hewan harus mendapatkan Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*) dari Komisi Etik yang dapat menilai protokol untuk hewan sebelum pengujian dimulai.

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 pemeliharannya;
- 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. Dioperasionalkan 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 terstandarisasi, 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 *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) 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 batas volume maksimal yang dapat diberikan adalah 5 mL, dan pada mencit 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) Obat Tradisional yang telah memiliki Nomor Izin Edar dapat menggunakan tiga kelompok dosis dengan 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. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

- 2) Obat Tradisional yang belum memiliki Nomor Izin Edar, penentuan kelompok dosis harus sesuai justifikasi ilmiah berdasarkan dengan uji pendahuluan dan/ atau 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. Konversi dosis dapat menggunakan metode lain seperti berdasarkan Luas Area Permukaan Tubuh sesuai dengan referensi ilmiah dengan justifikasi.

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
Marmut (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 sensitivitas, cara metabolisme sediaan uji yang serupa dengan manusia, serta mudahnya 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

Hewan uji yang digunakan harus jelas galur dan jika ada merupakan galur yang sensitif untuk pengujian farmakodinamik yang ditujukan. Jika tidak ada, dapat menggunakan galur untuk tikus yaitu Sprague Dawley dan Wistar, untuk mencit yaitu ddY, Swisswebster, BALB/c, untuk kelinci dapat menggunakan galur New Zealand White.

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 $22^{\circ} \pm 3^{\circ}$ 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 (cm ²)	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, harus dilakukan uji pendahuluan pada saat induksi untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik. Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi hewan uji.

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 hematologi dan biokimia klinis hewan uji dapat dilihat pada Tabel 4-8 di bawah ini (Darelanko, Michael J, Auletta, Carol S, 2014). Nilai normal parameter hewan uji dapat juga mengacu ke literatur lain yang valid.

Tabel 4. Rentang rata-rata pengukuran hematologi pada Tikus CD® (Sprague-Dawley)

Parameter	Umur 10-12 minggu	Umur 18-20 minggu	Umur 32-34 minggu
APTT (s)	14-20 (M)	14-20 (M)	14-17 (M)
	12-18 (F)	13-18 (F)	13-16 (F)
Jumlah Eritrosit ($10^6/\text{mm}^3$)	6,8-8,5 (M)	7,0-9,8 (M)	7,0-9,6 (M)
	7,0-8,2 (F)	6,5-9,2 (F)	6,5-8,8 (F)
Fibrinogen (mg/dL)	-	200-300 (M)	-
	-	130-190 (F)	-
Hematokrit (%)	40-48	36-52	36-50
Hemoglobin (g/dL)	14-17	14-17	14-17
Jumlah Leukosit, Total ($10^3/\text{mm}^3$)	6-18 (M)	6-19 (M)	6-18 (M)
	4-14 (F)	5-14 (F)	4-11 (F)
MCH (pg)	19-22	16-20	17-21
MCHC (g/dL)	33-38	31-38	31-38
MCV (fl)	53-63	50-60	45-60
Methemoglobin (% Hemoglobin)	0,4-1,2	0,4-1,2	0,4-1,2
Jumlah Platelet ($10^3/\text{mm}^3$)	900-1300	800-1200	700-1200
PT (s)	9-14	9-14	10-14

Jumlah Retikulosit (% RBC)	0,2-1,0	0,2-0,8	0,2-0,8
----------------------------	---------	---------	---------

Keterangan: (M)= Jantan, (F)= Betina

Tabel 5. Rentang kontrol rata-rata pengukuran hematologi tipikal pada Mencit CD-1 dan BALB/c

Parameter	1-3 Bulan BALB/c	6-12 Bulan BALB/c	<1 Tahun CD-1
Jumlah Eritrosit ($10^6/\text{mm}^3$)	8,5-10,5	8,8-10,6	8,0-10,0
Hematokrit (%)	42,5-47,9	38,3-46,9	36,9-46,9
Hemoglobin (g/dL)	14,5-16,8	14,2-17,0	13,6-16,8
Jumlah Leukosit Total ($10^3/\text{mm}^3$)	2,0-5,7	2,0-5,0	4,0-12,0 (M)
			3,5-9,7 (F)
MCH (pg)	15,8-18,4	15,1-17,5	16,1-18,6
MCHC (g/dL)	34,2-38,1	35,1-40,6	34,8-38,2
MCV (fl)	46,3-50,3	40,9-45,9	44,5-49,7
Jumlah Platelet ($10^3/\text{mm}^3$)	-	-	700-1400
Jumlah Retikulosit (% RBC)	-	-	1,6-3,7

Keterangan: (M)= Jantan, (F)= Betina

Tabel 6. Rentang Kendali Rata-Rata Pengukuran Hematologi Tipikal Pada Kelinci New Zealand White

Parameter	15-20 Minggu	25-40 Minggu	1-2 Tahun
APTT (s)	11,7-14,5	11,3-14,9	10,5-15,8
Jumlah Eritrosit ($10^6/\text{mm}^3$)	5,5-7,0	4,8-6,7	4,9-7,0
Fibrinogen (mg/dL)	125-300	125-300	125-400

Hematokrit (%)	37,0-44,5	37,0-44,5	37,5-44,7
Hemoglobin (g/dL)	12,0-14,7	10,9-14,4	10,5-14,8
Jumlah Leukosit, total ($10^3/\text{mm}^3$)	5,4-11,9	3,6-7,9	4,8-13,5
MCH (pg)	20,2-23,0	21,8-24,5	20,4-23,4
MCHC (g/dL)	32,3-34,9	32,2-34,8	30,0-34,1
MCV (fl)	61,4-68,6	64,8-69,5	64,8-72,0
Jumlah Platelet ($10^3/\text{mm}^3$)	175-500	175-500	200-500
Jumlah Retikulosit (% RBC)	0-2,0	0-2,0	0-3,0
PT (s)	8,2-9,8	8,0-10,0	8,0-10,3

Tabel 7. Rerata Pengukuran Biokimia Darah pada Tikus CD® (Sprague-Dawley)

Parameter	Rentang Umur 10-12 minggu	Rentang Umur 18-20 minggu	Rentang Umur 32-34 minggu
ALT (IU/L)	10-40	10-50	10-50
Albumin (g/dL)	3,4-4,1 (M)	3,3-4,2 (M)	3,5-4,0 (M)
	3,5-4,5 (F)	3,5-4,7 (F)	4,0-5,0 (F)
Rasio albumin/globulin	1,0-1,5	1,0-1,5	1,0-1,5
<i>Alkaline phosphatase</i> (IU/L)	140-300 (M)	50-150 (M)	50-150 (M)
	80-100 (F)	25-150 (F)	25-150 (F)
AST (IU/L)	45-90	45-100	45-120
Asam empedu, total ($\mu\text{mol/L}$)	20-60	20-60	-
Bilirubin, total (mg/dL)	0,2-0,4	0,1-0,5	0,1-0,5
Kalsium (mg/dL)	9,8-12,0	9,8-12,0	9,8-12,0

Klorida (mEq/L)	97-105	97-105	95-105
Kolesterol, total (mg/dL)	50-85	50-100	70-140
Kreatin kinase (IU/L)	50-400	50-300	50-500
Kreatinin (mg/dL)	0,3-0,8	0,3-0,9	0,3-1,0
γGT (IU/L)	0-2	0-2	0-3
Globulin (g/dL)	2,5-4,0	2,5-4,0	2,0-4,5
Glukosa (mg/dL)	90-175	100-175	100-200
LDH (IU/L)	50-400	50-400	50-500
Fosfor, anorganik (mg/dL)	7,0-10,0	4,0-8,5	4,0-8,0
Kalium (mEq/L)	5,5-8,0	4,0-7,0	4,0-7,0
Protein, total (g/dL)	6,2-7,6 (M)	6,2-7,8 (M)	6,2-8,0 (M)
	6,3-8,2 (F)	6,5-8,5 (F)	7,0-9,0 (F)
Natrium (mEq/L)	140-153	140-153	140-153
SDH (IU/L)	10-30	10-30	10-30
Trigliserida (mg/dL)	50-125	50-200	50-200
BUN (mg/dL)	12-18	12-20	12-20

Keterangan: (M)= Jantan, (F)= Betina

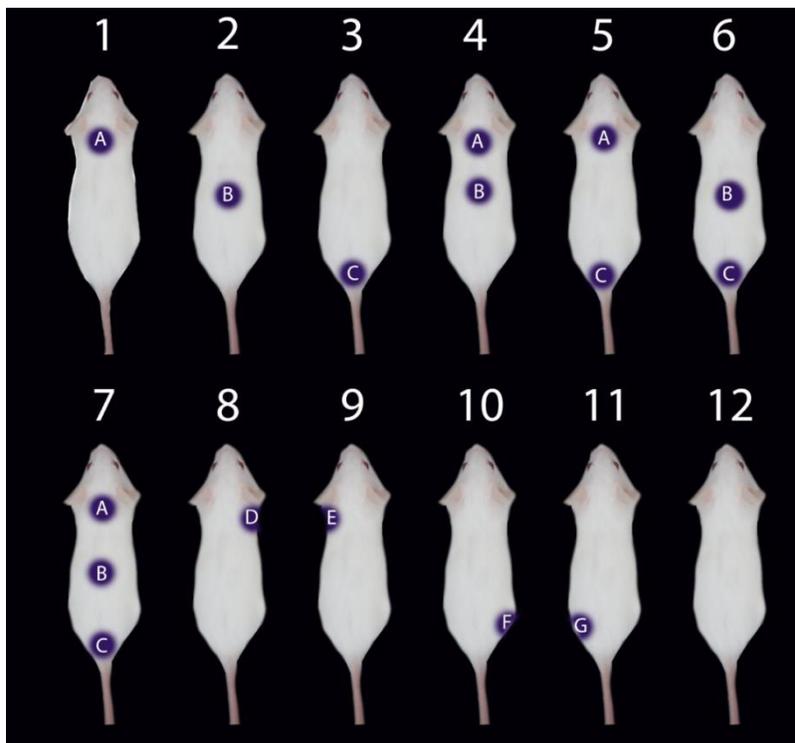
Tabel 8. Rerata Pengukuran Biokimia Darah pada Mencit CD-1 dan BALB/c

Parameters	Rentang Umur <1 tahun CD-1	Rentang Umur >1 tahun CD-1	Rentang Umur 1-3 bulan BALB/c	Rentang Umur 6-12 bulan BALB/c
ALT (s)	30-250 (M)	20-200 (M)	-	-
	30-100 (F)	20-80 (F)	-	-

Albumin (g/dL)	-	-	1,6-2,6	1,3-2,6
Rasio albumin/globulin	-	-	-	-
<i>Alkaline Phosphatase</i> (IU/L)	30-70	20-75	75-275	47-102
AST (IU/L)	75-300	75-300	40-140	70-110
Bilirubin, total (mg/dL)	0,2-0,8	0,2-0,8	0,5-1,2	0,4-1,0
Kalsium (mg/dL)	8,5-11,5	6,7-11,5	7,8-10,8	6,5-9,6
Klorida (mEq/L)	110-125	110-135	-	-
Kolesterol, total (mg/dL)	90-170(M)	60-170	165-295	100-300
	60-125 (F)	50-100 (F)	-	-
Kreatin kinase (IU/L)	-	-	-	-
Kreatinin (mg/dL)	0,3-1,0	0,2-2,0	-	-
Globulin (g/dL)	-	-	-	-
Glukosa (mg/dL)	75-175	60-150	75-150	40-160
Fosfor, anorganik (mg/dL)	7,5-11,0	6,0-10,0	4,5-8,9	4,7-7,2
Kalium (mEq/L)	6,5-9,0	6,6-9,0	-	-
Protein, total (g/dL)	4,5-6,0	3,5-5,6	4,4-6,0	4,4-6,4
Natrium (mEq/L)	145-160	155-170	-	-
Trigliserida (mg/dL)	60-140 (M)	40-150 (M)		
	50-100 (F)	25-75 (F)	-	-
BUN (mg/dL)	20-40	20-70	10-30	10-30

Keterangan: (M)= Jantan, (F)= Betina

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 9.



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

Tabel 9. 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

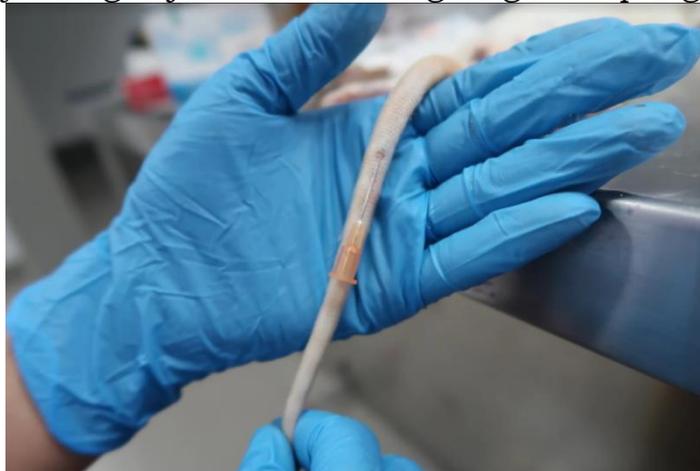
Pengambilan darah menggunakan alat suntik steril atau alat yang sesuai yang steril dan selalu dijaga agar tidak terjadi hemolisis. Pada umumnya pengambilan darah yang terlalu banyak pada hewan kecil akan menyebabkan syok hipovolemik, stres, dan bahkan dapat menyebabkan kematian. Pengambilan darah yang 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.

Pada saat pengambilan darah, jika diperlukan dilakukan anestesi terlebih dahulu menggunakan metode yang sesuai misalnya menggunakan metode penyuntikan dengan *ketamine* dan *xylazine* (8:1).

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

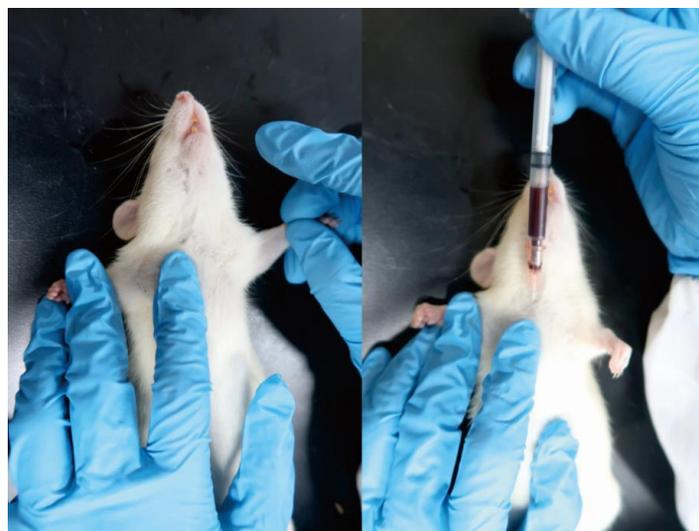
Hewan sebelumnya dianestesi, lokasi pengambilan darah pada sinus retro-orbitalis mata dengan menggunakan pipet Pasteur atau tabung hematokrit. Aplikasi dapat dilakukan dengan menusukkan pipet dengan sudut kemiringan 45°. Sampel dapat diperoleh dari kedua mata secara bergantian (Gambar 6). Metode ini 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.

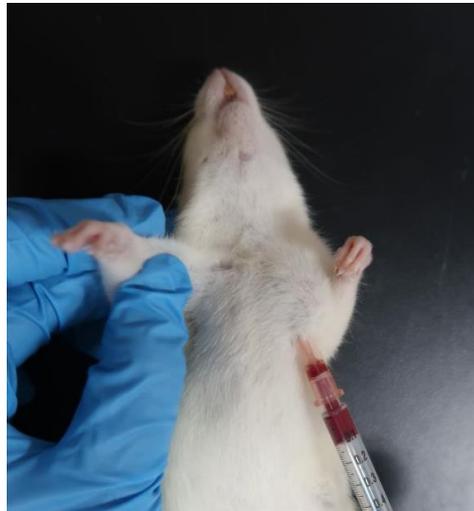


Gambar 7. Pengambilan darah tikus di vena jugularis
(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

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 di atas persendian tarsal. Kaki belakang perlu ditahan lalu sedikit ditarik agar posisi ekstensi. Bagian kaki tepat di atas 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 (-20° 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 galur Sprague-Dawley atau Wistar yang diinduksi hipertensi.

2) Pengelompokan hewan uji

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

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

d) Kelompok perlakuan (hewan uji hipertensi) diberi pakan standar, perlakuan induksi hipertensi dan diberi bahan uji minimal tiga kelompok dosis. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Induksi hewan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

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

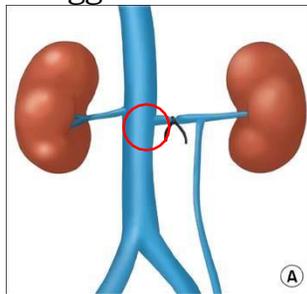
a) Hewan uji hipertensi karena kelainan ginjal akut

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 atau lebih sampai tercapai keberhasilan dan kestabilan 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, 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

Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. 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 darah sistolik, tekanan darah 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 diatas normal. Dislipidemia merupakan faktor risiko primer untuk penyakit jantung koroner (PJK) dan stroke. Pada tikus rentang umur 10-12 minggu kadar kolesterol total darah normal adalah 50-80 mg/dL dan kadar LDL normal adalah 19-20 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 serta pengukuran HDL yang kemudian ditetapkan 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 galur 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 yang digunakan berjenis kelamin jantan, dikelompokkan sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberikan pakan standar dan 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. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Induksi hewan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

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

- a) Pemberian pakan yang mengandung lemak dan kolesterol tinggi per oral selama 4 minggu atau lebih sampai tercapai keberhasilan dan kestabilan induksi.
- b) Pemberian 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 lebih sampai tercapai keberhasilan dan kestabilan induksi.
- c) Pemberian 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 stabil ditunjukkan dengan peningkatan kadar kolesterol total individual hewan uji minimal 1,5 kali kadar kolesterol total dari kelompok kontrol normal dan peningkatan kadar LDL individual hewan uji minimal 1,5 kali dari kelompok kontrol normal. Kadar tersebut digunakan sebagai kadar baseline.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. Pemberian sediaan uji per oral dilakukan setelah induksi dislipidemia berhasil. Sediaan uji diberikan secara per oral selama 4-6 minggu. Pemberian senyawa induksi dan/atau prosedur induksi tetap dilakukan sampai selesai pengujian.

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 dipuaskan 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). 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 galur 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 yang digunakan berjenis kelamin jantan, 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. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Induksi hewan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

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 subkutan 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

Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. 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 *Buffer Neutral Formalin* (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.

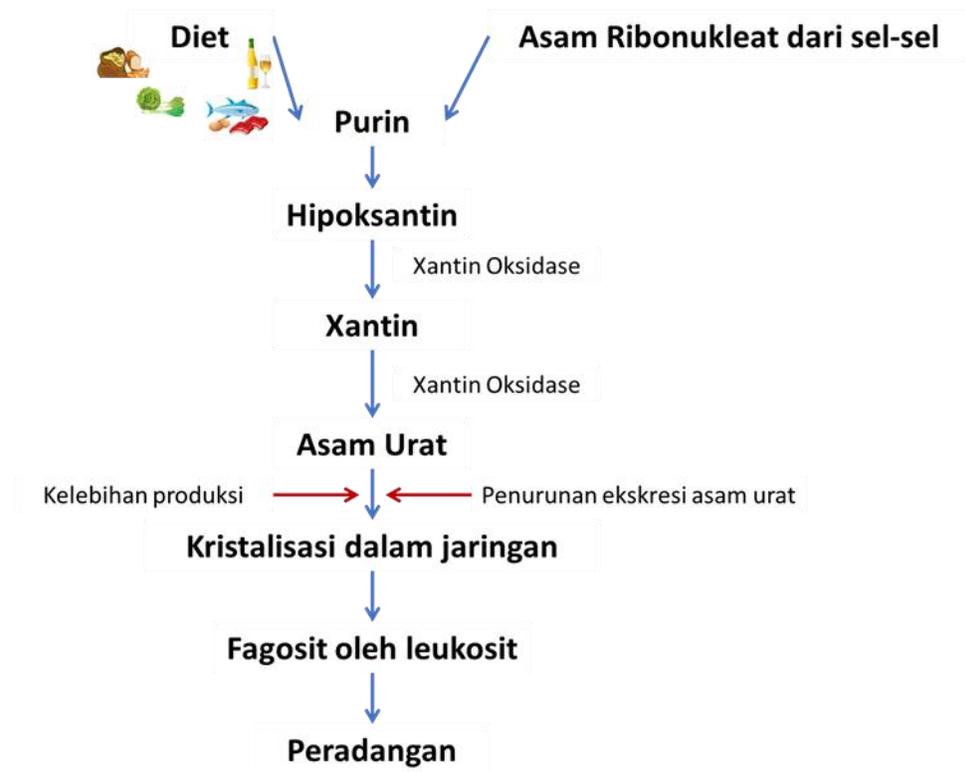
c. Evaluasi

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). 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 guanosis 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 diberi 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 galur 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 yang digunakan berjenis kelamin jantan, 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. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Induksi hewan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

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

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 individual hewan uji dari 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 individual hewan uji dari 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

Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. 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 untuk metode induksi urikostatik atau urin untuk metode induksi urikosurik. Dilakukan dengan metode penetapan kadar asam urat yang valid yang direkomendasikan

menggunakan spektrofotometri.

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 tikus rentang umur 10-12 minggu adalah 90-175 mg/dL, sedangkan kadar glukosa darah pada 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 yang digunakan berjenis kelamin jantan, 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. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Induksi hewan uji Diabetes Melitus Tipe II

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

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 atau lebih sampai tercapai keberhasilan dan kestabilan induksi. Pada metode induksi ini, pembanding obat standar yang disarankan yaitu metformin.

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 6-8 jam 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

Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. 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 yang direkomendasikan menggunakan spektrofotometri. 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. 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 yang digunakan berjenis kelamin jantan, dikelompokkan menjadi beberapa kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar serta pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak membuat diare.
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji diare) diberi pakan standar serta perlakuan induksi diare dan diberi pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak membuat diare.
- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji diare) diberi pakan standar serta 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 pakan standar serta perlakuan induksi diare dan diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Induksi hewan uji dan prosedur pemberian sediaan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

Dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. 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 AKUT

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* dan karagenan), 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 galur 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 ekor per kelompok sebagai berikut:

a) Kelompok kontrol negatif

- (1) Telinga kiri hewan uji tidak diberi perlakuan.

- (2) Telinga kanan hewan uji diberi bahan pemicu inflamasi (larutan iritan *croton oil*).
 - b) Kelompok kontrol positif
 - (1) Telinga kiri hewan uji tidak diberi perlakuan.
 - (2) 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
 - (1) Telinga kiri hewan uji tidak diberi perlakuan.
 - (2) Telinga kanan hewan uji diberi sediaan uji yang dilarutkan dalam larutan pemicu inflamasi (larutan iritan *croton oil*) pada minimal tiga kelompok dosis. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.
- 3) Induksi hewan uji
- Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.
- 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
- Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. 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. 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 diklofenak atau Ibuprofen), obat standar, sediaan uji dan pembawa.
- c) Hewan uji tikus jantan galur 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%). Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Prosedur pemberian sediaan uji

Dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. Sebelum pemberian larutan per oral hewan uji dipuasakan 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

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

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. 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 tinggi 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.

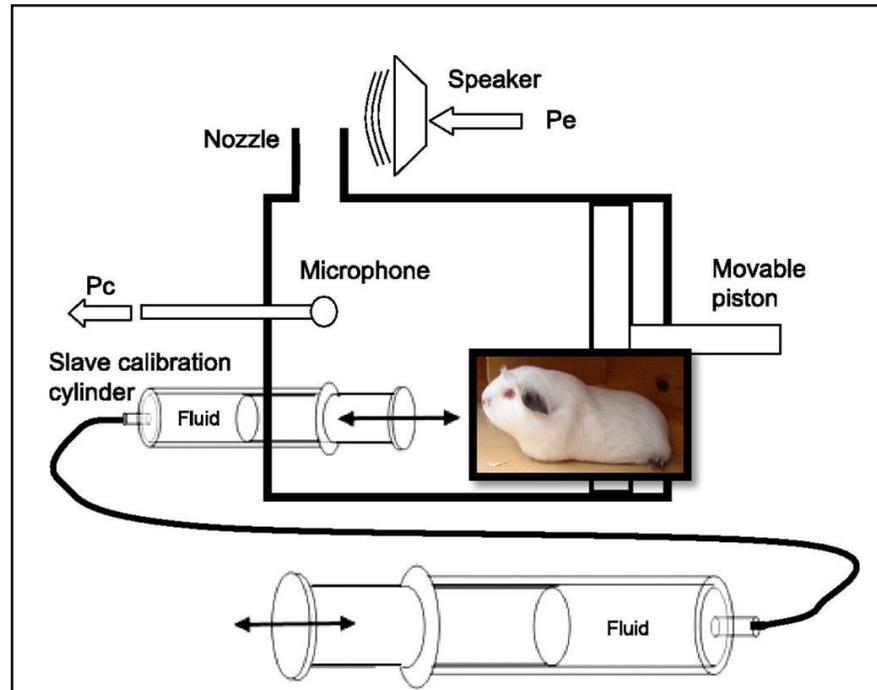
b. Metode Uji Antitusif

1) Alat, bahan dan hewan uji

a) Alat: kandang hewan, *sprit 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 galur *Dunkin-Hartley* dengan bobot 300 – 400 g.



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:

- Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar serta bahan pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi frekuensi batuk.
- Kelompok kontrol negatif (hewan uji batuk) diberi pakan standar serta 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.
- Kelompok kontrol positif (hewan uji batuk) diberi pakan standar serta dipaparkan 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 pakan standar serta dipaparkan 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. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Induksi hewan uji dan prosedur pemberian sediaan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

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.

Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas.

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:

$$\% PPB = 1 - \left(\frac{B}{A}\right) \times 100\%$$

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. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Prosedur pemberian sediaan uji

Dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. 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:

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

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 sensitivitas 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. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Prosedur pemberian sediaan uji

Dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti 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

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

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 sensitivitas 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 di atas 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 1 β (IL-1 β) 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 mengaktifasi neuron *thermoregulator* pada area anterior hipotalamus (area untuk meningkatkan temperatur tubuh). Pada umumnya obat antipiretik bekerja dengan cara menghambat enzim siklooksigenase dan menurunkan jumlah Prostaglandin E2 (PGE2) di dalam 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°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 pakan dan minum standar
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji demam) diberi pakan dan minum standar dan induksi bahan kimia yang menyebabkan demam.
- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji demam) diberi pakan dan minum standar 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 pakan dan minum standar dan induksi bahan kimia yang menyebabkan demam serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Induksi hewan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

- 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 dipuasakan, suhu ruangan dijaga pada 22-25°C. Setelah 18 jam atau sesuai dengan waktu yang dibutuhkan terjadinya peningkatan suhu, dilakukan pengukuran suhu di rektal. 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°C. Pemberian sediaan uji dilakukan setelah terjadinya demam.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji 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°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.

K. IMUNOSTIMULAN

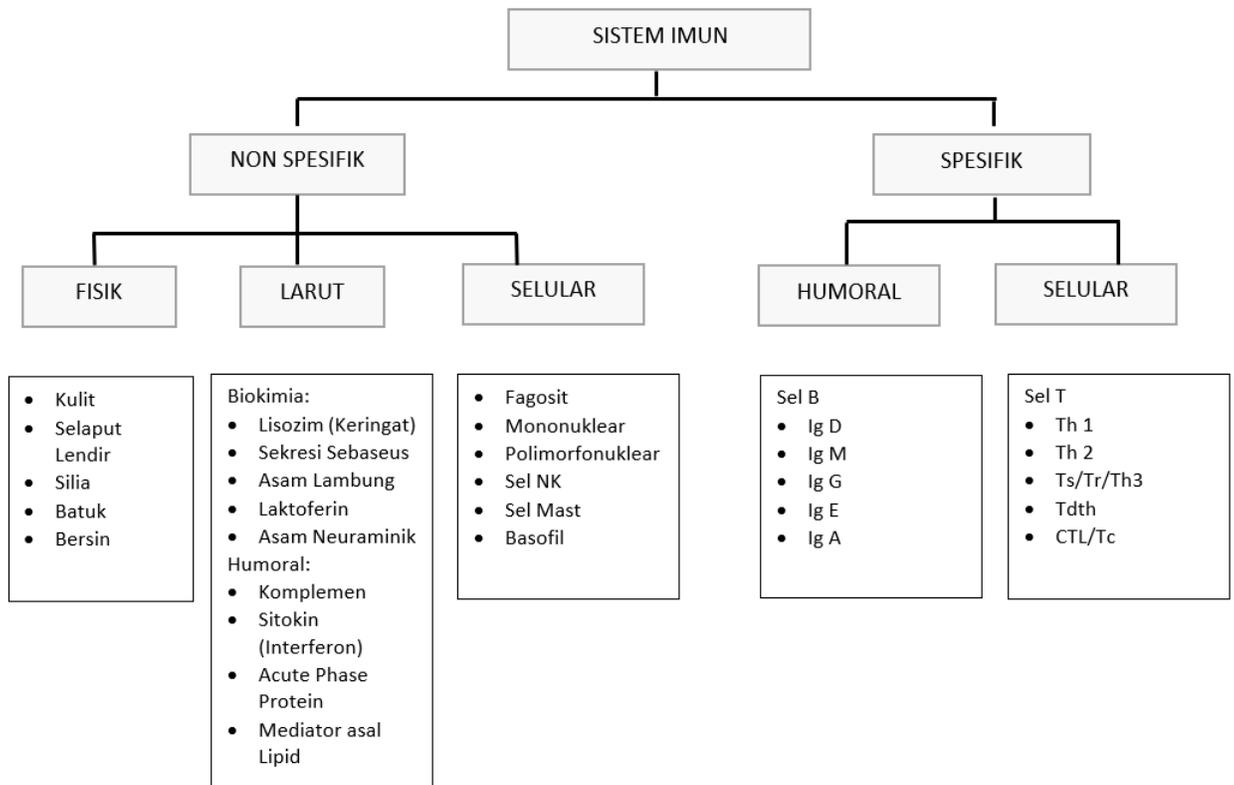
1. Patofisiologi Imunostimulan

Sistem kekebalan adalah kompleks yang terintegrasi dari sel, jaringan, organ, dan mediator terlarut yang terlibat dalam mempertahankan organisme terhadap bahan asing (xenobiotika) yang mengancam integritas organisme. Salah satu fitur utama dari sistem kekebalan adalah kemampuannya untuk membedakan antara diri sendiri (sel dan jaringan sendiri) dan bahan asing (molekul asing dan mikroba lingkungan).

Keutuhan tubuh dipertahankan oleh sistem pertahanan yang terdiri atas sistem imun nonspesifik (*natural/innate*) dan spesifik (*adaptive/acquired*). Sistem imun nonspesifik seperti inflamasi, interferon, sel natural killer dan sistem komplemen merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme. Sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda asing dan memerlukan waktu sebelum memberikan responnya. Bila sistem tersebut terpajan ulang dengan benda asing yang sama, maka akan segera dikenali dan dihancurkan.

Sistem imun nonspesifik dapat bekerja melalui mekanisme fisika, media terlarut, dan seluler. Salah satu mekanisme sistem imun nonspesifik seluler adalah fagositosis. Meskipun berbagai sel dalam tubuh dapat melakukan fagositosis, sel utama yang berperan pada pertahanan nonspesifik adalah sel mononuklear (monosit dan makrofag) serta sel polimorfonuklear seperti neutrofil. Fagositosis dini yang efektif pada invasi kuman, akan dapat mencegah timbulnya penyakit. Proses fagositosis terjadi dalam beberapa tingkat sebagai berikut: kemotaksis, menangkap, membunuh dan mencerna.

Sistem imun spesifik terdiri atas humoral dan seluler. Respon imun spesifik humoral ditandai dengan pelepasan berbagai produksi imunoglobulin oleh sel limfosit B. Antibodi atau imunoglobulin (Ig) adalah golongan protein yang dibentuk sel plasma (proliferasi sel B) setelah terjadi kontak dengan antigen. Antibodi ditemukan dalam serum dan jaringan dan mengikat antigen secara spesifik. IgG merupakan komponen utama (terbanyak) imunoglobulin serum. IgG dapat mengaktifkan komplemen, meningkatkan pertahanan badan melalui opsonisasi dan reaksi inflamasi. IgM (M berasal dari makroglobulin) merupakan Ig terbesar. IgM dapat mencegah gerakan mikroorganisme patogen, memudahkan fagositosis dan merupakan aglutinator kuat terhadap butir antigen, juga merupakan antibodi yang dapat mengikat komplemen dengan kuat dan tidak menembus plasenta. Gambaran komponen-komponen sistem imun dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Komponen-komponen sistem imun (sumber: Setiati *et al.*, 2014)

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Tujuan pengujian imunostimulan untuk memelihara atau meningkatkan fungsi kekebalan dapat menggunakan hewan uji normal yang tidak mengalami defisiensi imunitas namun diberikan senyawa tertentu sebagai *challenge* test misal menggunakan vaksin. Hewan uji diberi sediaan uji sampai waktu yang ditentukan. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan indeks stimulasi melalui pengujian fagositosis, parameter hematologi dan pengujian kadar sitokin untuk melihat respon imun nonspesifik serta pengujian titer antibodi untuk melihat respon imun spesifik 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, mikropipet, tabung mikrosentrifus, timbangan, sentrifus dan spektrofotometer *UV-Visible*, *microplate reader*.

- b) Bahan: sediaan uji, pembanding, bahan penginduksi/*challenge test*.
- c) Hewan uji: tikus atau mencit galur BALB/c.

2) Pengelompokan hewan uji

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

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar, serta diberikan pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi respon imun.
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji yang dilakukan *challenge test*) diberi pakan standar, diberikan pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi respon imun, serta dilakukan *challenge test*.
- c) Kelompok perlakuan (hewan uji yang dilakukan *challenge test*) diberi pakan standar dan dilakukan *challenge test* serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Pemberian senyawa *challenge test* atau induksi hewan uji.

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

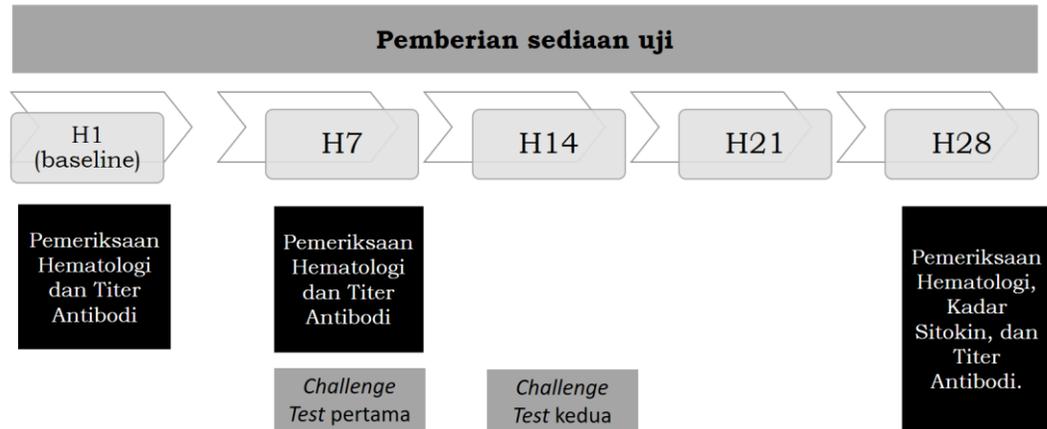
Uji tantang dengan vaksin

- a) Pemberian vaksin Hepatitis B berdasarkan dosis hasil orientasi pada uji pendahuluan pada hari ke 7 dan ke 14 perlakuan (misalnya secara intraperitoneal dapat menggunakan dosis 0,4 mL/ekor tikus 2 kali pemberian) untuk menghasilkan 20 μ L HbsAg. Jika diperlukan dapat dilakukan *booster* untuk memperoleh titer antibodi yang lebih tinggi.
- b) Pemberian vaksin *Tetanus Toxoid* (TT) (berdasarkan dosis dan interval pemberian sesuai dengan hasil orientasi pada uji pendahuluan (misalnya secara intraperitoneal atau intramuskular dapat menggunakan dosis 15 *Limit of Flocculation* (Lf)/ ekor 2 kali pemberian pada tikus atau mencit). Jika diperlukan dapat dilakukan *booster* untuk memperoleh titer antibodi yang lebih tinggi.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Selama jangka waktu tertentu misalnya 28 hari atau sesuai hasil orientasi pada uji pendahuluan, hewan uji diberi sediaan

uji dengan dosis yang telah ditentukan sesuai dengan tingkatan dosis. Prosedur pemberian sediaan uji, ujiantang/*challenge test* dan pengukuran parameter setiap hewan uji dilakukan dalam beberapa tahap (misalnya sesuai contoh pada Gambar 16). Selama masa pengujian hewan uji ditimbang setiap hari.



Gambar 16. Prosedur pemberian sediaan uji, ujiantang/*challenge test* dan pengukuran parameter

Pemberian sediaan uji umumnya sebelum pemberian bahan ujiantang/*challenge test*. Setelah beberapa waktu tertentu misalnya pada hari ke 7 diberi ujiantang/*challenge test* pertama kemudian pada hari ke 14 diberikan ujiantang/*challenge test* kedua. Pengukuran parameter dilakukan berdasarkan hasil uji pendahuluan yang dipengaruhi oleh jenis antigennya. Secara umum, dilakukan pengukuran parameter (kecuali parameter sitokin) pada 3 (tiga) titik yaitu (1) pada saat baseline (H1), (2) pada saat setelah diberi sediaan uji namun sebelum diberi bahan ujiantang/*challenge test* pertama (misalnya H7) serta (3) pada saat setelah diberi sediaan uji terakhir atau setelah diberi bahan ujiantang/*challenge test* kedua yang telah menunjukkan efek (misalnya H28)). Waktu pemberian sediaan uji dan pengukuran parameter sesuai dengan hasil pada uji pendahuluan. Pengukuran parameter secara lengkap dapat dilihat pada bagian 5) Pengukuran parameter imunostimulan.

Jika diperlukan, booster dilakukan pada hari ke 28 setelah pengukuran parameter hematologi dan titer antibodi. Waktu pengujian termasuk pemberian sediaan uji ditambah 10 (sepuluh) hari. Pada hari ke 38 dilakukan pengukuran parameter hematologi, sitokin dan titer antibodi. Waktu pemberian sediaan uji dan pengukuran parameter sesuai

dengan hasil pada uji pendahuluan.

5) Pengukuran parameter imunostimulan

Sebelum dilakukan randomisasi dan perlakuan terhadap hewan uji, maka dilakukan pengukuran parameter hematologi sebagai baseline terhadap: jumlah leukosit, limfosit, eosinofil, basofil dan hemoglobin. Hanya hewan uji yang memiliki nilai kadar hematologi dalam rentang normal yang dapat dilakukan randomisasi dan perlakuan lebih lanjut.

a) Pengukuran Parameter Imunostimulan untuk Respon Imun Nonspesifik.

(1) Parameter Hematologi

Dilakukan pengukuran parameter hematologi setelah perlakuan minimal terhadap jumlah leukosit, limfosit, eosinofil, basofil dan hemoglobin dengan menggunakan *cell counter* otomatis atau metode yang sesuai.

(2) Parameter Kadar Sitokin

Dilakukan pengukuran parameter kadar sitokin terhadap *Interferon Gamma* (IFN- γ) dengan menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sesuai dengan petunjuk informasi pada *manufacturer procedure* atau metode lain yang sesuai.

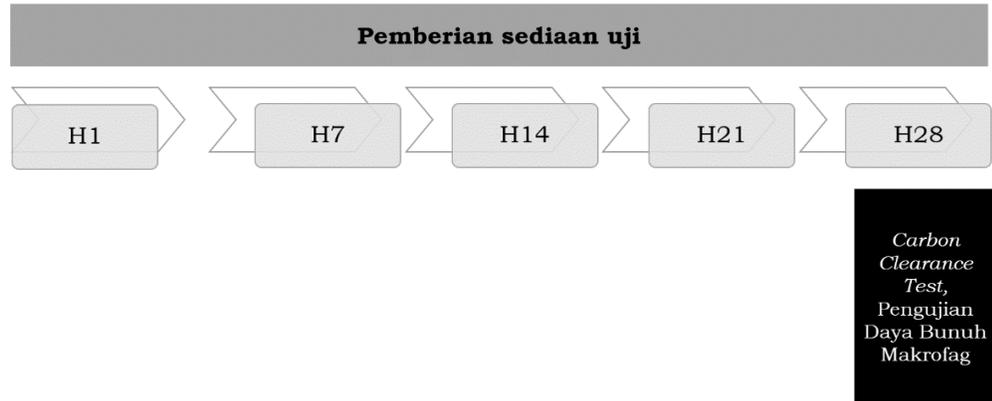
b) Pengukuran Parameter Imunostimulan untuk Respon Imun Spesifik.

Parameter Titer Antibodi

Dilakukan pengukuran aktivitas imunitas humoral melalui pengujian titer antibodi terhadap kadar IgG dan IgM spesifik antigen dengan menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sesuai dengan petunjuk informasi pada *manufacturer procedure* atau metode yang sesuai.

6) Pengukuran Parameter Uji Fagositosis

Selama jangka waktu tertentu sesuai dengan jangka waktu pemberian sediaan uji pada pengujian *challenge test* misalnya 28 hari atau sesuai hasil orientasi pada uji pendahuluan, hewan uji diberi sediaan uji dengan dosis yang telah ditentukan sesuai dengan tingkatan dosis. Prosedur pemberian sediaan uji dan pengukuran parameter Uji Fagositosis (misalnya sesuai contoh pada Gambar 17). Jumlah hewan dan kelompok dosis uji sesuai dengan pengujian pada pemberian *challenge test*. Selama masa pengujian hewan uji ditimbang setiap hari.



Gambar 17. Prosedur pemberian sediaan uji dan pengukuran parameter Uji Fagositosis

- a) *Carbon Clearance Test* (hewan uji merupakan hewan yang berbeda dari penelitian diatas (pemberian *challenge test*))
Setelah pemberian sediaan uji selama jangka waktu tertentu misalnya 28 hari atau sesuai uji pendahuluan, dilakukan pengukuran aktivitas fagositosis dengan menggunakan uji carbon-clearance. Mencit diinjeksi dengan 0,1 mL/ kg BB suspensi karbon secara intravena melalui pembuluh darah di ekor. Pada menit ke-0 (sebelum penyuntikan karbon) dan menit ke-5, 10, 15 dan 20 setelah penyuntikan karbon dilakukan pengambilan darah. Sebanyak 25 µl darah ditambahkan ke dalam 4 mL larutan asam asetat 1% dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 640 nm menggunakan spektrofotometer *UV-Visible* atau menggunakan metode yang sesuai.
Perhitungan konstanta kecepatan eliminasi karbon (K), indeks fagositosis (α) dan indeks stimulasi dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$K (\text{Indeks Fagositosis}) = \frac{\log OD5 - \log OD20}{t_2 - t_1}$$

$$\text{Indeks Stimulasi} = \frac{\text{Indeks fagositosis kelompok uji}}{\text{Indeks fagositosis kelompok kontrol}}$$

Dimana:

OD5 = absorbansi pada menit ke-5

OD20 = absorbansi pada menit ke-20

T₁ = waktu pertama pengambilan darah

T₂ = waktu kedua pengambilan darah

b) Pengujian Daya Bunuh Makrofag

Dilakukan Pengujian Daya Bunuh Makrofag pada hewan uji yang dilakukan *Carbon Clearance Test* terhadap perhitungan nitrat oksida (NO), atau *myeloperoksidase* (MPO), atau beta glukorinidase berdasarkan metode yang sesuai.

c. Evaluasi

Dilakukan pengukuran parameter hematologi, parameter kadar sitokin, dan parameter uji fagositosis untuk melihat respon imun nonspesifik serta pengukuran parameter titer antibodi untuk melihat respon imun spesifik setelah diberikan sediaan uji. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan pada kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

L. ANTITUKAK LAMBUNG

1. Patofisiologi Tukak Lambung

Lambung dilindungi terhadap faktor iritan oleh lapisan mukus/mukus barrier dan epitel, tetapi beberapa faktor iritan seperti makanan, minuman, obat anti inflamasi non steroid (OAINS), alkohol dan empedu dapat menimbulkan defek lapisan mukus dan terjadi difusi balik ion H⁺, sehingga timbul gastritis akut/kronik dan tukak gaster. Penyakit tukak peptik yaitu tukak lambung dan tukak duodenum merupakan penyakit yang masih banyak ditemukan dalam klinik terutama dalam kelompok umur di atas 45 tahun.

Tukak peptik secara anatomis didefinisikan sebagai suatu defek mukosa/submukosa yang berbatas tegas dan dapat menembus muskularis mukosa sampai lapisan serosa sehingga terjadi perforasi. Secara klinis, suatu tukak adalah hilangnya epitel superfisial atau lapisan lebih dalam dengan diameter > 5 mm yang dapat diamati secara endoskopis atau radiologis.

Tukak lambung adalah gangguan ulseratif pada saluran cerna bagian atas yang dipicu adanya sekresi asam lambung berlebih dan adanya kehilangan faktor defensif. Tukak terjadi karena gangguan keseimbangan antara faktor agresif dengan faktor defensive. Penyebab umum terjadinya tukak lambung adalah penggunaan OAINS, adanya infeksi *Helicobacter pylori* (HP), dan faktor stress yang menyebabkan gangguan saluran cerna seperti sakit perut, mual, muntah, kehilangan berat badan, perdarahan dan perlukaan hingga komplikasi.

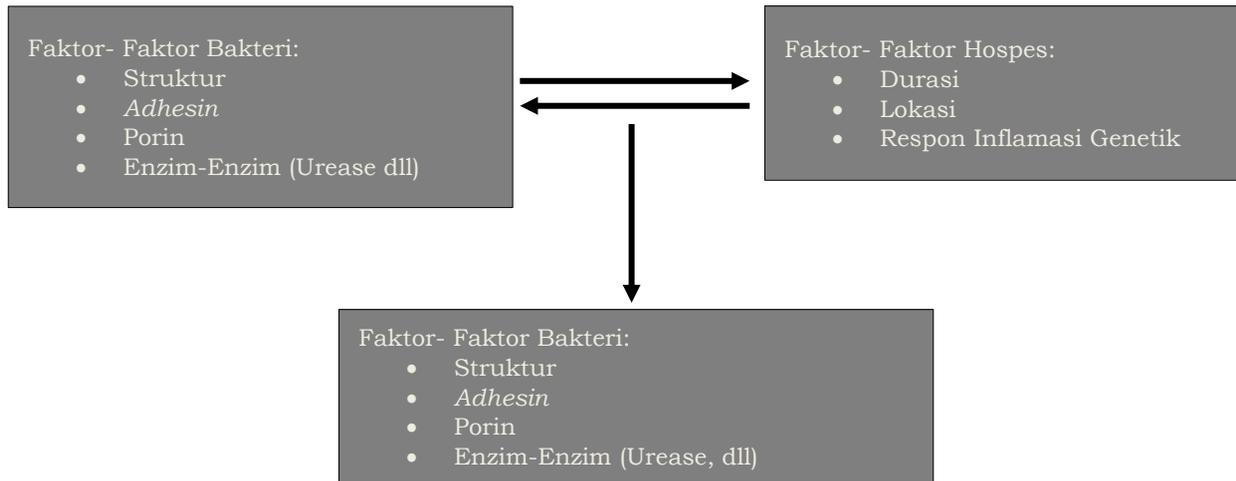
Faktor agresif penyebab tukak adalah asam, pepsin, infeksi HP, dan OAINS. Sel parietal mengeluarkan asam lambung HCl, sel peptik/*zymogen* mengeluarkan pepsinogen yang oleh HCl dirubah menjadi pepsin, dimana HCl dan pepsin adalah faktor agresif. Bahan

iritan dapat menimbulkan defek barrier mukosa dan merangsang histamin untuk lebih banyak mengeluarkan asam lambung. Sementara itu, kurangnya faktor defensif dapat menyebabkan terjadinya tukak seperti: stress emosional berlebihan yang dapat meningkatkan kadar kortisol kemudian diikuti peningkatan sekresi asam lambung dan pepsinogen, serta gaya hidup tidak sehat seperti merokok dan konsumsi alkohol.

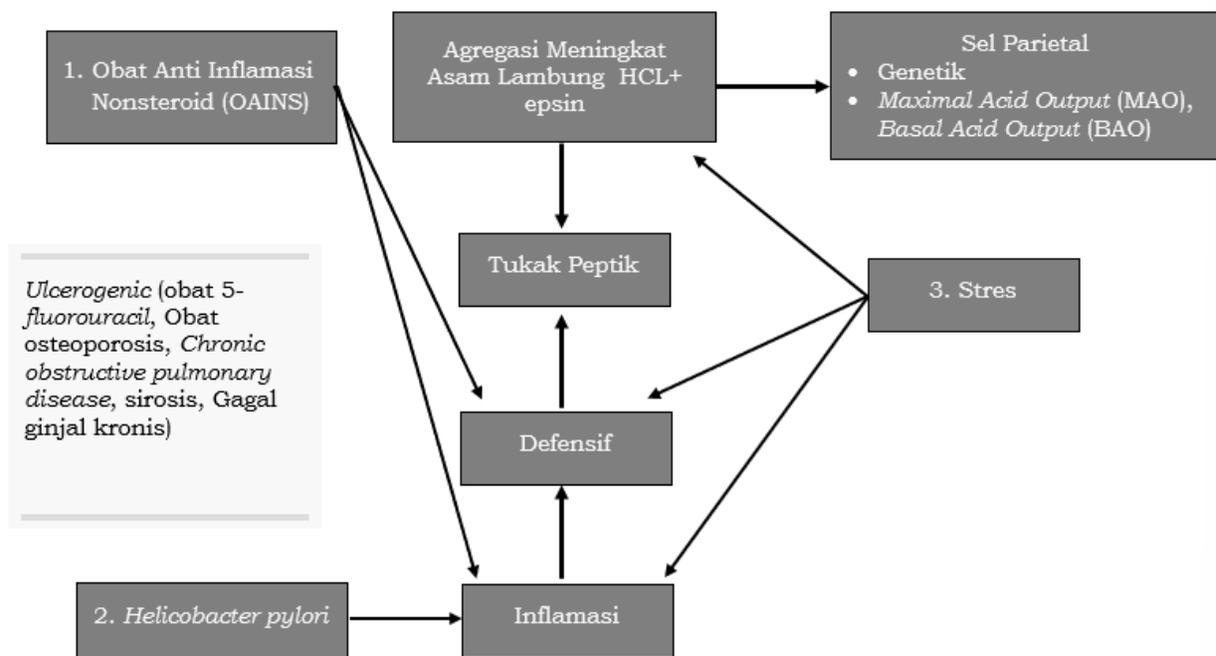
Terdapat beberapa teori mengenai patofisiologi tukak peptik. Beberapa dari teori tersebut yaitu:

- a. Faktor Asam Lambung “*No Acid Peptic Activity No Ulcer*” Shwartz 1910; Pengaturan Sekresi Asam Lambung pada Sel Parietal
Sel parietal mengeluarkan asam lambung HCl, sel peptik/*zymogen* mengeluarkan pepsinogen yang oleh HCl dirubah menjadi pepsin dimana HCl dan pepsin adalah faktor agresif terutama pepsin dengan pH < 4 (sangat agresif terhadap mukosa lambung). Bahan iritan akan menimbulkan defek barrier mukosa dan terjadi difusi balik ion H⁺.
Membran plasma sel epitel lambung terdiri dari lapisan-lapisan lipid bersifat pendukung barrier mukosa. Sel parietal lambung dipengaruhi oleh faktor genetik. Seseorang dapat mempunyai sel parietal yang besar/sekresi lebih banyak. Tukak lambung yang letaknya dekat pilorus atau dijumpai bersamaan dengan tukak duodenal biasanya disertai hipersekresi asam, sedangkan bila lokasinya pada tempat lain di lambung biasanya disertai hiposekresi asam.
- b. Faktor Ketidakseimbangan Homeostasis Asam Lambung dari Shay and Sun: *Balance Theory* 1974
Tukak terjadi bila ada gangguan keseimbangan antara faktor agresif/asam dan pepsin dengan defensif (mukus, bikarbonat, aliran darah, prostaglandin), bisa faktor agresif meningkat atau faktor defensif menurun.
- c. Faktor Infeksi *Helicobacter pylori* (HP) “*No HP No Ulcer*” dari Warren and Marshall 1983
HP adalah kuman patogen gram negatif berbentuk batang/spiral, mikroaerofilik berflagela hidup pada permukaan epitel. Tukak lambung kebanyakan disebabkan oleh infeksi HP (30-60%) dan OAINS sedangkan tukak duodenum hampir 90% disebabkan oleh HP. Garis besar pengobatan tukak peptik adalah eradikasi kuman HP serta pengobatan/pencegahan gastropati OAINS.

Faktor yang mempengaruhi terbentuknya kelainan gastroduodenal dinyatakan pada Gambar 18, serta berbagai penyebab tukak peptik dinyatakan pada Gambar 19.



Gambar 18. Faktor yang mempengaruhi terbentuknya kelainan gastrointestinal (sumber: Setiati *et al.*, 2014)



Gambar 19. Berbagai penyebab tukak peptik (sumber: Setiati *et al.*, 2014)

Keterangan:

- OAINS : Obat Antiinflamasi Nonsteroid
- MAO : *Maximal Acid Output*
- BAO : *Basal Acid Output*
- 5 FU : 5-fluorouracil
- COPD : *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*
- GGK : Gagal Ginjal Kronis
- HP : *Helicobacter pylori*

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Aktivitas anti tukak lambung dievaluasi pada hewan uji yang telah diinduksi dengan pemberian zat tertentu seperti indometasin, asam asetilsalisilat, etanol, HCl, asam asetat atau metode lain yang sesuai yang sudah menunjukkan keberhasilan induksi. Selanjutnya hewan uji diberi sediaan uji selama waktu yang ditentukan. Jika diperlukan dapat dipertimbangkan kombinasi beberapa metode. Evaluasi manfaat sediaan uji dengan membandingkan indeks tukak, luas tukak dan histopatologi lambung pada kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Selain itu, dapat dilakukan pengujian ketebalan mukosa lambung.

b. Metode Uji

1) Metode Uji Induksi dengan Bahan Kimia Peroral

a) Alat, bahan dan hewan uji.

- (1) Alat: kandang hewan, sonde, pinset, blade, alat bedah, mikroskop cahaya, stereomikroskop, peralatan histopatologi.
- (2) Bahan: bahan penginduksi tukak lambung, sediaan uji, bahan pembawa, bahan anestesi.
- (3) Hewan Uji: Tikus.

b) Pengelompokan hewan uji

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

- (1) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar dan diberikan pembawa sediaan uji yang bersifat inert.
- (2) Kelompok kontrol negatif (hewan uji tukak lambung) diberi pakan standar dan induksi bahan kimia yang menyebabkan tukak lambung serta pembawa sediaan uji sampai akhir pengujian.
- (3) Kelompok kontrol positif (hewan uji tukak lambung) diberi pakan standar dan induksi bahan kimia yang menyebabkan tukak lambung serta diberi obat standar dengan konversi dosis terapi manusia. Obat standar tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.

(4) Kelompok perlakuan (hewan uji tukak lambung) diberi pakan standar dan induksi bahan kimia yang menyebabkan tukak lambung serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

c) Induksi hewan uji dan pemberian sediaan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik berdasarkan pengamatan makroskopis lambung yang telah menunjukkan terjadinya tukak.

Hewan dapat diinduksi dengan memberikan bahan penginduksi sebagai berikut:

- (1) Indometasin peroral dengan dosis 20-100 mg/kg BB atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan.
- (2) Asam asetilsalisilat peroral dengan dosis 150 mg/kg BB atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan.
- (3) Etanol 80-96% per oral 1-5 ml/kg BB atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan.
- (4) HCl 150mM : etanol absolut 40:60 v/v atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan.

Dilakukan pemberian induksi dengan menggunakan salah satu bahan penginduksi di atas dengan dosis, selang waktu atau interval tertentu berdasarkan hasil uji pendahuluan (sampai tercapai keberhasilan dan kestabilan induksi). Keberhasilan induksi dapat dipertahankan dengan tetap memberikan bahan penginduksi dengan memperhatikan survival hewan uji. Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti di atas. Hewan uji diberikan sediaan uji secara peroral sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan setelah dilakukan induksi (sesuai uji pendahuluan). Sediaan uji diberikan setiap hari selama beberapa hari misalnya selama 5-7 hari atau sesuai dengan tujuan pemberian (sesuai uji pendahuluan). Hewan uji dikorbankan setelah perlakuan pemberian sediaan uji selesai dan dilakukan pembedahan serta isolasi lambung untuk dianalisa pengamatan parameter untuk evaluasi indeks tukak lambung.

2) Metode Uji Induksi dengan Asam Asetat Lokal

a) Alat, bahan dan hewan uji.

- (1) Alat: kandang hewan, sonde, pinset, blade, alat bedah, mikroskop cahaya, stereomikroskop, peralatan histopatologi
 - (2) Bahan: asam asetat, sediaan uji, bahan pembawa, bahan anestesi.
 - (3) Hewan Uji: Tikus.
- b) Pengelompokan hewan uji
Hewan uji yang digunakan berjenis kelamin jantan, dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor per kelompok sebagai berikut:
- (1) Kelompok kontrol normal sham (hewan uji normal), hewan uji dibedah tanpa diberikan induksi asam asetat, diberi pakan standar dan diberikan pembawa sediaan uji yang bersifat inert.
 - (2) Kelompok kontrol negatif (hewan uji tukak lambung), hewan uji dibedah dan diberikan induksi asam asetat, diberi pakan standar serta pembawa sediaan uji sampai akhir pengujian.
 - (3) Kelompok kontrol positif (hewan uji tukak lambung), hewan uji dibedah dan diberikan induksi asam asetat, diberi pakan standar serta diberi obat standar dengan konversi dosis terapi manusia. Obat standar tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
 - (4) Kelompok perlakuan (hewan uji tukak lambung), hewan uji dibedah dan diberikan induksi asam asetat, diberi pakan standar serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.
- c) Induksi hewan uji dan pemberian sediaan uji
Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik berdasarkan pengamatan makroskopis lambung yang telah menunjukkan terjadinya tukak.
Hewan uji dianestesi kemudian dibedah bagian perutnya untuk membuat ulkus menggunakan asam asetat. Asam asetat dituang ke mukosa lambung yang sebelumnya telah dibatasi oleh cincin (pada area permukaan serosa lambung bagian corpus). Asam asetat 65-85% dituang lalu 30-45 detik kemudian larutan asam dibuang atau sesuai dengan hasil orientasi pada uji pendahuluan. Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. Dilakukan pemberian sediaan uji selama 2

minggu atau jangka waktu tertentu sesuai dengan tujuan pemberian. Hewan uji dikorbankan dan dilakukan pembedahan serta isolasi lambung untuk dianalisa pengamatan parameter untuk evaluasi indeks tukak lambung.

3) Pengukuran Parameter

Pengukuran parameter tukak lambung dilakukan terhadap parameter sebagai berikut:

a) Pengamatan sebelum hewan dikorbankan: perubahan fisik maupun tingkah laku serta adanya efek samping lain (diare/defekasi/urinasi berlebihan/liur berlebihan)

b) Indeks Tukak

(1) Jumlah lesi yang terbentuk.

Dilakukan perhitungan jumlah tukak yang terbentuk. Keparahan dari tukak dicatat dan diberi skor. Ulkus yang terlihat pada permukaan lumen lambung diamati. Parameter pengamatan ulkus terdiri dari jumlah dan jenisnya.

Contoh penentuan skor:

0 = tidak tukak

1 = tukak pada permukaan (*superficial*)

2 = tukak dalam

3 = perdarahan

(2) Persentase hewan yang mengalami tukak

(3) Dilakukan persentase hewan yang mengalami tukak pada setiap kelompok perlakuan.

(4) Perhitungan Indeks Tukak

(5) Indeks tukak dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$U_I = U_N + U_S + U_P \times 10^{-1}$$

UI = Indeks Tukak

U_N = Rata-rata jumlah tukak per hewan uji

U_S = Rata-rata skor keparahan tukak

U_P = Persentase hewan uji dengan tukak

c) Luas daerah tukak lambung

Dilakukan pengukuran luas daerah tukak lambung yang diperoleh dengan menggunakan metode yang sesuai misalnya metode ImageJ. Luasan luka dapat diukur dengan metode pembatasan area dan perhitungan luasan dalam milimeter persegi (mm²).

Rumus persentase area lesi:

$$\% \text{ area lesi} = \frac{(\text{total area lesi})}{(\text{total area lambung})} \times 100\%$$

Perhitungan *Ulcer Level Indeks* (ULI) dapat dilakukan. Berikut adalah contoh klasifikasi area lesi yang selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai ULI:

Level I → area lesi $<1 \text{ mm}^2$

Level II → area lesi $1-3 \text{ mm}^2$

Level III → area lesi $>3 \text{ mm}^2$

Perhitungan ULI

$$= (1x(\text{jumlah tukak level I})) + (2x(\text{jumlah tukak level II})) + (3x(\text{jumlah tukak level III}))$$

d) Histopatologi lambung

Dilakukan pengukuran parameter histopatologi lambung dengan pewarnaan yang sesuai untuk mengetahui kerusakan ulcer, deskuamasi, sel peradangan dan keparahan lesi. Pengamatan histopatologi dilakukan oleh 2 (dua) peneliti yang berbeda dengan dasar pengamatan yang sama.

Skoring histopatologi ditetapkan berdasarkan referensi yang valid. Berikut merupakan contoh skoring berdasarkan Alazzouni, A.S et al (2020):

(1) Lesi *sporadic, punctuate*

(2) Beberapa lesi kecil

(3) Kerusakan mukosa extensive 1 area, atau multiple kerusakan sedang mukosa lambung

(4) Beberapa kerusakan besar mukosa lambung

(5) Beberapa kerusakan besar dengan perforasi lambung yang nyata

e) Uji ketebalan mukus sebagai parameter tambahan.

Dapat dilakukan pengukuran parameter uji ketebalan mukus dengan melakukan histopatologi lambung dengan pewarnaan yang sesuai yang diamati di bawah mikroskop cahaya yang dihubungkan dengan komputer yang dilengkapi software misalnya Optika Vision Light 2.1 atau metode yang sesuai untuk mengukur ketebalan mukosa.

c. Evaluasi

Dievaluasi parameter tukak lambung yang diamati yaitu indeks tukak, luas tukak dan histopatologi lambung sebagai parameter utama dan dapat ditambahkan uji ketebalan mukus sebagai parameter tambahan. 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.

M. PELANCAR AIR SUSU IBU (ASI)

1. Patofisiologi Pelancar ASI

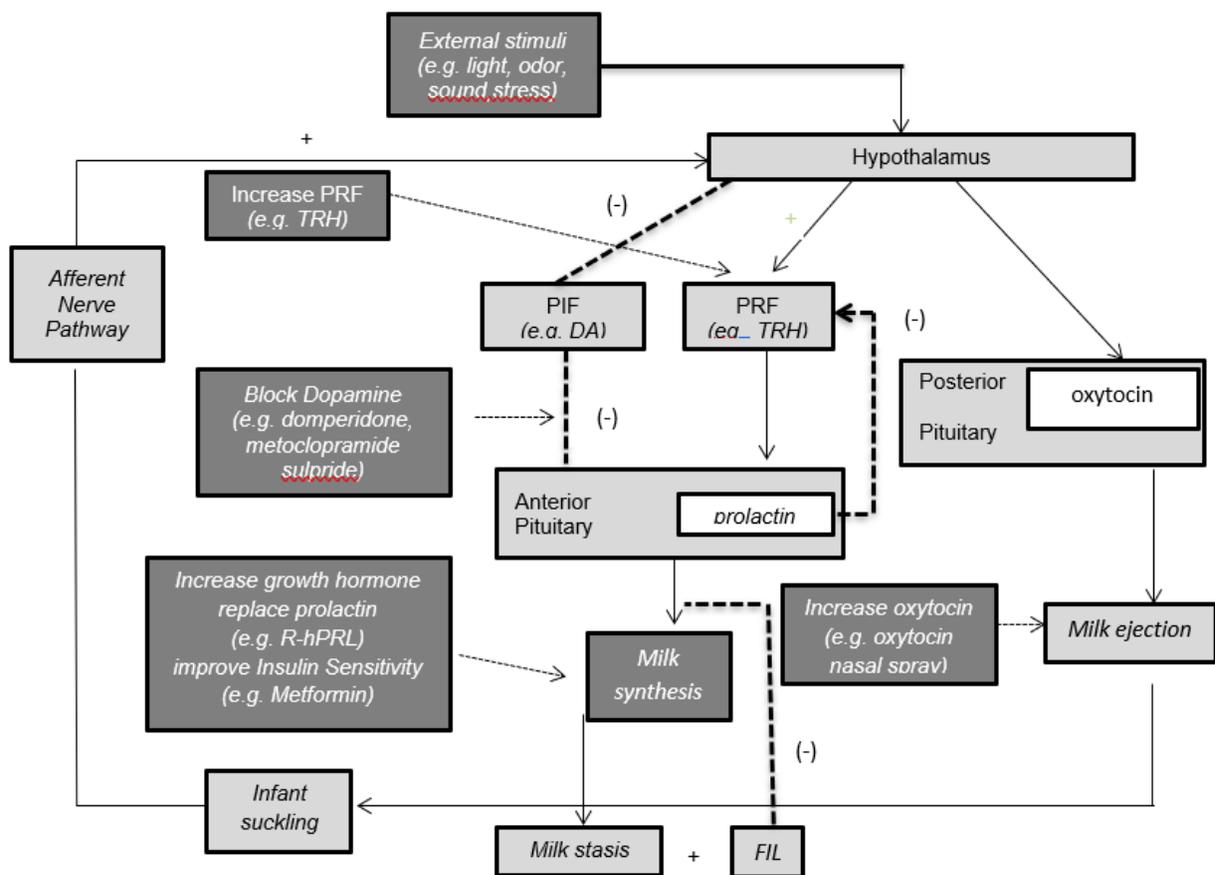
ASI secara umum merupakan sumber nutrisi dari infant (bayi) yang baru lahir, bersifat steril, suhu sesuai, mengandung protein, lemak, karbohidrat, mikronutrien dan bahan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. Kegagalan laktasi didefinisikan sebagai kebutuhan pemberian ASI untuk bayi dalam waktu 3 bulan setelah melahirkan karena pasokan ASI yang tidak mencukupi. Kegagalan laktasi total didefinisikan sebagai tidak adanya aliran susu secara total atau sekresi sedikit setelah menyusui setidaknya 7 hari. Faktor yang berpengaruh pada keberhasilan laktasi yaitu usia, pendidikan, status sosial ekonomi, agama, struktur keluarga, dan lingkungan tempat tinggal.

Patofisiologi laktasi dipengaruhi oleh lingkungan hormon yang kompleks termasuk hormon reproduksi (estrogen, progesteron, laktogen, prolaktin, dan oksitosin) dan hormon metabolik (glukokortikoid, insulin, hormon pertumbuhan dan tiroid). Hormon reproduksi bertindak langsung pada kelenjar payudara, sedangkan hormon metabolik bertindak secara tidak langsung dengan mengubah respon endokrin dan fluks nutrisi ke kelenjar susu. Selama kehamilan, tingginya kadar progesteron yang bersirkulasi menghambat proses sekretori kelenjar susu. Setelah proses melahirkan dan plasenta keluar, kadar progesteron menurun dengan cepat dan meningkatnya kadar prolaktin memicu awal *lactogenesis* II yang merupakan onset berlebih pada sekresi susu. Dua mekanisme serupa namun independen terlibat dalam pembentukan laktasi (*lactogenesis*); mekanisme pertama menyebabkan rilis prolaktin dan yang kedua menginduksi pelepasan oksitosin. Hormon prolaktin berperan dalam melepaskan ASI ke dalam alveoli, kemudian hormon oksitosin merangsang epitel alveoli untuk berkontraksi agar dapat mengeluarkan ASI dari kelenjar payudara.

Melihat pentingnya peran prolaktin dan oksitosin dalam meregulasi sekresi dan ejsi ASI, hormon-hormon tersebut seringkali dijadikan target farmakologis untuk mempengaruhi pasokan ASI. Secara singkat, produksi prolaktin di pituitari anterior dipengaruhi keberadaan *prolactin inhibiting factors* (PIF) dan *prolactin releasing factors* (PRF), yang dikontrol oleh hipotalamus. Konsentrasi faktor-faktor tersebut dipengaruhi oleh stimulus eksternal seperti gerakan menghisap bayi, suara tangisan bayi dan stress. Kunci PIF utama adalah dopamin, yang mempunyai efek

menghambat produksi prolaktin. Sebaliknya, hormon-hormon yang menstimulasi produksi prolaktin yaitu *thyrotropin releasing hormone*, kortisol dan oksitosin. Beberapa hormon lain yang mempengaruhi kelenjar mammae untuk sintesis ASI yaitu *growth hormone*, prolaktin dan insulin.

Terdapat 3 kunci utama dalam pasokan ASI yang adekuat yaitu jaringan kelenjar mammae yang cukup, tingkat hormon yang normal dan pengeluaran ASI yang rutin dan efektif. Insufisiensi kelenjar mammae dapat disebabkan seperti operasi payudara (mastektomi, pengeluaran kista). Tingkatan hormon dapat dipengaruhi plasenta yang menetap, perdarahan postpartum yang parah, hipotiroidisme, tingginya tingkat stress dan ansietas, beberapa obat-obatan, anemia, diabetes, obesitas, *polycystic ovary syndrome*, merokok dan konsumsi alkohol. Gambaran fisiologi laktasi dapat ditemukan pada Gambar 20.



Gambar 20. Fisiologi laktasi.
(sumber: Setiati *et al.*, 2014)

Keterangan: TRH, *thyrotropin releasing hormone*; PIF, *prolactin inhibitory factor*; PRF, *prolactin releasing factor*; DA, dopamin; R-hPRL, *recombinant human prolactin*; FIL, *feedback inhibitor of lactation*.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Hewan uji dilakukan proses perkawinan terlebih dahulu dan dilakukan penyiapan hewan uji post-partum. Hewan uji yang dirandomisasi adalah yang melahirkan anak tikus dalam jumlah rentang berdekatan. Selanjutnya hewan uji diberi sediaan uji selama waktu tertentu dan diamati parameter pengukuran produksi ASI. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan parameter pengukuran produksi ASI dan penambahan bobot badan anak tikus serta jika diperlukan melakukan evaluasi terhadap kadar prolaktin, perbedaan berat badan induk tikus dan histologi kelenjar *mammary* 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 uji, sonde oral, peralatan gelas, alat-alat gelas, timbangan hewan, timbangan analitik, peralatan histopatologi.
- b) Bahan: Sediaan uji, obat pembanding.
- c) Hewan uji yang digunakan adalah Tikus Wistar/Sprague Dawley jantan bobot 200-250 g dan usia 8-10 minggu. Tikus Wistar/Sprague Dawley betina nullipara (belum pernah hamil dan melahirkan), berumur 8-10 minggu (setelah aklimatisasi) dengan berat badan minimal 150 g.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji betina post-partum dikelompokkan secara acak menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor. Hewan uji dikelompokkan sebagai berikut:

- a) Kontrol negatif diberi pakan standar serta pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi produksi ASI.
- b) Kelompok kontrol positif diberi pakan standar serta diberi domperidone atau metoklopramid (konversi dosis terapi manusia) yang dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- c) Kelompok perlakuan diberi pakan standar serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis atau berdasarkan uji pendahuluan. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Penyiapan hewan uji post-partum

Hewan uji dilakukan proses perkawinan yaitu dengan menempatkan satu tikus jantan dan empat tikus betina dalam satu kandang (hewan betina pada fase pro-estrus) atau satu jantan dan beberapa betina lainnya. Fase pro-estrus tikus betina dapat diketahui melalui metode *ulas vagina* setiap hari. Terjadi perkawinan ditandai dengan adanya sumbat vagina pada tikus betina. Tikus betina yang sudah kawin dipisahkan dari kelompok perkawinannya ke kandang individu dan dilakukan pengamatan kehamilan secara periodik. Rata – rata 21 hari tikus dipelihara sampai melahirkan dan masa laktasi terjadi. Tikus yang dipilih adalah yang melahirkan anak tikus dalam jumlah rentang berdekatan (misal yang memiliki 5 atau 6 anak tikus). Apabila jumlah anak tikus bervariasi antar induk tikus, maka jumlah anak tikus yang diikuti dalam penelitian diseragamkan dengan mengorbankan anak tikus lainnya.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Dilakukan randomisasi pada tikus yang dipilih yang melahirkan anak tikus dalam jumlah rentang berdekatan sesuai pengelompokan hewan uji seperti diatas. Setelah tikus melahirkan, sediaan uji diberikan dan dihitung sebagai hari ke-0. Pemberian sediaan uji dilakukan selama masa pemberian ASI yaitu setelah anak tikus dilahirkan sampai minimal dua minggu atau jangka waktu tertentu sesuai dengan tujuan pemberian.

c. Parameter Pengukuran Produksi ASI

1) Pengukuran produksi air susu

Pengukuran produksi air susu dilakukan secara tidak langsung yaitu dengan penimbangan bobot anak tikus sebelum dan sesudah menyusui, selisih bobot anak tikus sebelum dan sesudah menyusui memiliki korelasi positif terhadap volume air susu. Pengukuran produksi ASI diukur dari bobot anak tikus yang dilakukan pada jam yang sama pada hari ke 1, 3, 7 dan hari ke 14 laktasi.

a) Cara pengukuran 1:

- (1) Pada saat pengukuran, anak tikus ditimbang pada bobot awal (w_1), selanjutnya diisolasi dari induknya selama 4 jam dan ditimbang kembali (w_2).
- (2) Setelah itu anak tikus dikembalikan kepada induk dan dibiarkan menyusui selama satu jam setelah itu ditimbang kembali (w_3)

- (3) Selisih berat badan anak tikus setelah menyusui sebagai $(w_3 - w_2)$. Terdapat faktor koreksi energi yang hilang dengan nilai koefisien metabolisme yang digunakan adalah $[w_2 - w_1]/4$. Nilai koefisien metabolisme ini kemudian ditambahkan pada selisih berat badan anak tikus setelah menyusui menjadi perolehan produksi air susu.

$$\text{Produksi ASI} = (w_3 - w_2) + \frac{[w_2 - w_1]}{4}$$

b) Cara Pengukuran 2:

- (1) Anak tikus ditimbang (w_1) dan selanjutnya diisolasi terpisah dari induknya selama 4 jam anak tikus ditimbang (w_2) dan dikembalikan ke induknya untuk disusui selama 1 jam serta ditimbang lagi (w_3).
- (2) Berikutnya, anak tikus diisolasi terpisah dari induknya selama 4 jam, kemudian ditimbang lagi (w_4) sebelum dikembalikan lagi ke induknya untuk disusui selama 1 jam dan akhirnya ditimbang kembali (w_5). Anak tikus kemudian ditinggalkan bersama induknya sepanjang malam.
- (3) Produksi ASI pada pengukuran pertama dan kedua perlakuan dihitung berdasarkan perbedaan berat badan anak tikus sebelum dan sesudah menyusui dengan menggunakan rumus $[(w_3-w_2)$ dan $(w_5-w_4)]$. Produksi ASI tersebut dikoreksi nilai koefisien metabolisme sebesar $[w_2-w_1]/4$ atau $[w_4-w_3]/4$.

$$\text{Produksi ASI pengukuran pertama} = (w_3 - w_2) + \frac{[w_2 - w_1]}{4}$$

$$\text{Produksi ASI pengukuran kedua} = (w_5 - w_4) + \frac{[w_4 - w_3]}{4}$$

2) Pengukuran pertambahan bobot badan anak tikus

Pengukuran pertambahan bobot badan anak tikus dilakukan sejak usia anak tikus 3 hari hingga 14 hari. Pengukuran ini dilakukan dengan menghitung selisih bobot badan anak tikus dari hari ke-3 dengan hari ke-1, dan juga hari ke-7 dengan hari ke-3 dan hari ke-14 dengan hari ke-7. Bobot anak tikus harian ditimbang menggunakan timbangan analitik dengan akurasi 4 digit.

3) Penentuan kadar prolaktin (sebagai parameter tambahan)

Dilakukan pengukuran kadar prolaktin. Prosedur pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke 14 setelah

diberikan sediaan uji. Sampel darah disentrifugasi dan plasma darah dilakukan pengukuran kadar prolaktin berdasarkan metode yang sesuai.

- 4) Pengukuran Berat Badan Induk Tikus (sebagai parameter tambahan)

Berat badan induk tikus ditimbang setiap hari dan dihitung perbedaan berat badan antara hari ke-3 dan ke-14 setelah persalinan.

- 5) Histologi Kelenjar *Mammary* (sebagai parameter tambahan)

Pada akhir penelitian, jika diperlukan hewan uji dikorbankan dan dilakukan isolasi kelenjar *mammary* untuk dilakukan histologi dengan metode yang sesuai. Pengamatan dilakukan pada adanya pembesaran duktus dan kelenjar *alveolar mammary*.

- d. Evaluasi

Evaluasi dilakukan terhadap produksi air susu dan pertambahan bobot badan anak tikus, serta jika diperlukan melakukan evaluasi terhadap kadar prolaktin, perbedaan berat badan induk tikus dan histologi kelenjar *mammary*. 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.

N. MEMPERBAIKI GANGGUAN HATI

1. Patofisiologi Gangguan Hati

Hati bersifat multifungsi dan berkaitan dengan proses metabolisme karbohidrat, protein, lemak dan vitamin. Gangguan fisiologis hati dapat disebabkan oleh kelainan:

- a. Prehepatik, misalnya pada anemia hemolitik. Pada keadaan ini, fisiologis hati pada umumnya normal kecuali bilirubin.
- b. Intra hepatik atau hepatoseluler, misalnya pada hepatitis, sirosis dan karsinoma hepatis. Tes fisiologis hati pada keadaan ini umumnya ditandai dengan peningkatan enzim *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT), *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT), *Alkaline Phosphatase* (ALP), *Gamma Glutamyl Transferase* (γ GT), protein abnormal, dan bilirubin dapat bervariasi.
- c. *Post hepatic* atau obstruksi karena batu empedu dan tumor. Dalam keadaan ini bilirubin dan alkali fosfatase meningkat, SGOT

dan SGPT dapat meningkat.

Pada pedoman lebih difokuskan pada gangguan hati intra hepatic atau hepatoseluler.

Hati memiliki 2 peranan penting pada tubuh, yaitu metabolisme dan detoksifikasi. Metabolisme hati meliputi metabolisme karbohidrat, lemak dan protein. Hati juga berfungsi untuk detoksifikasi darah dari benda asing. Peran ini dimainkan oleh sel Kupffer. Obat dan seringkali bahan toksik dimodifikasi oleh hati dan dibuat menjadi inaktif atau larut air melalui konjugasi dengan senyawa kimia lain. Dengan proses ini, hati memberi sinyal pada tubuh untuk mengekskresikan zat-zat tersebut. Pedoman farmakodinamik ini terkait dengan fungsi detoksifikasi hati.

Hati memiliki peran utama dalam metabolisme xenobiotik dan berhubungan dengan saluran pencernaan. Hati sangat rentan mengalami kerusakan yang diakibatkan dari obat-obatan atau xenobiotik. Hampir 75% darah yang mencapai hati berasal dari organ pencernaan dan limpa melalui vena porta, oleh karena itu obat-obatan dan xenobiotik berada dalam bentuk terkonsentrasi. Kerusakan hati terjadi karena metabolit aktif yang berasal dari obat-obatan dan xenobiotik bereaksi dengan makromolekul seluler seperti protein, lipid dan asam nukleat yang mengakibatkan disfungsi protein, lipid peroksidase, kerusakan DNA dan stress oksidatif.

Hati mensintesis, mengkonsentrasikan dan mensekresi asam empedu dan mengekskresikan bahan toksik lain seperti bilirubin. Cedera yang diinduksi oleh obat (*Drug-Induced injury*) pada hepatosit dan sel duktus empedu dapat menjadikan terjadinya kolestasis. Kolestasis, di lain pihak, menyebabkan akumulasi asam empedu yang toksik di intrahepatik dan ekskresi produk yang dapat menambah cedera hepar.

Mekanisme hepatotoksisitas dari obat-obatan dan xenobiotik lainnya dalam konteks fisiologi hepar metabolisme dan biologi sel dibagi menjadi:

a. Apoptosis hepatosit yang diinduksi asam empedu

Pembentukan asam empedu merupakan fungsi esensial hepar dan kegagalan pembentukan asam empedu adalah patofisiologi kolestasis. Retensi asam empedu pada hepatosit pada kolestasis diasosiasikan dengan apoptosis hepatosit. Asam empedu yang bersifat hidrofobik terutama sangat hepatotoksik dan terakumulasi pada hepar pada penyakit kolestasis. Kegagalan sekresi asam empedu menghasilkan cedera hepar, sirosis dan kematian.

b. Adhesi molekul dan stress oksidan pada cedera hepar inflamasi

Sepsis/endotoksemia, hepatitis alkoholik dan cedera iskemik-reperfusi, serta beberapa hepatotoksisitas dari obat-obatan

tertentu dikarakterisasikan dengan inflamasi sistemik dan lokal dengan masuknya makrofag dan neutrofil ke dalam pembuluh darah hepar. Fungsi utama fagosit tersebut adalah untuk merusak mikroorganisme yang menginvasi dan menghilangkan sel-sel mati serta debris sel sebagai persiapan untuk regenerasi jaringan, namun karena sifat mediator toksik yang dihasilkan oleh fagosit-fagosit tersebut, sel sehat juga dapat terkena efeknya dan dapat memperparah cedera hepar yang ada sebelumnya.

c. Toksisitas CYP2E1-*Dependent* pada Sel HepG2

Cytochrome P4502E1 (CYP2E1) memetabolisasi dan mengaktivasi banyak substrat yang toksik, seperti etanol, tetraklorida karbon, asetaminofen, dan N-nitrosodimetilamin, menjadi produk yang lebih toksik. Metabolisme etanol yang CYP2E1-*dependent* memproduksi stress oksidatif melalui pembentukan *reactive oxygen species* (ROS). Induksi CYP2E1 oleh etanol merupakan *pathway* sentral dimana etanol menghasilkan stress oksidatif dan muncul bersamaan dengan cedera hepar alkoholik dan peroksidasi lipid.

d. Peroksinitrit pada hepatotoksisitas yang diinduksi obat (*drug-induced injury*)

Pada kasus overdosis, asetaminofen menyebabkan terjadinya nekrosis sentrilobular hepar. Metabolisme *cytochrome* P450 menjadi *N-asetil-p-benzoquinoneimine* (NAPQI) merupakan langkah kritis. NAPQI bereaksi terhadap glutation hepar (GSH) dan menjadikan GSH berkurang sampai 90%.

e. Hepatotoksisitas karena disfungsi mitokondria

1) Steatosis mikrovesikular

Gangguan *mitochondrial fatty acid β -oxidation* menyebabkan steatosis mikrovesikular, yang dikarakterisasi dengan akumulasi vesikel lipid kecil pada sitoplasma hepatosit. Karena oksidasi mitokondrial yang buruk, *nonesterified fatty acids* (NEFAs) berakumulasi pada hepar dan menjadi trigliserida.

2) Steatohepatitis nonalkoholik (NASH)

NASH berkembang secara progresif pada pasien dengan steatosis yang dapat menjadi kematian sel, badan *Mallory*, infiltrar sel polinuklear, fibrosis dan sirosis. NASH muncul pada pasien dengan obesitas/hipertrigliseridemia/sindroma resisten insulin, atau dapat diinduksi oleh amiodaron kronis, perheksilin atau pemberian dietilaminoetoksiheksesrol.

3) Hepatitis sitolitik

Hepatitis sitolitik merupakan lesi hepar yang *severe* yang dapat menyebabkan kegagalan hepar dan terlibat dalam uncoupling mitokondrial dan inhibisi respiratori.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Hewan uji diinduksi dengan pemberian zat tertentu yang dapat menginduksi gangguan /kerusakan fungsi hati, ditunjukkan dengan adanya peningkatan parameter enzim hati minimal 2 (dua) kali lipat dari nilai normal pada saat baseline dengan minimal pengujian terhadap *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT), *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT) tetapi dapat ditambah dengan parameter lain sesuai dengan tujuan penelitian yang dilakukan seperti *Gamma Glutamyl Transferase* (γ GT), *Alkaline Phosphatase* (ALP) dan lain-lain. Selanjutnya hewan uji diberikan sediaan uji dalam jangka waktu tertentu kemudian diamati penurunan parameter enzim hati (SGPT, SGOT) dan hasil histopatologi hati serta parameter lain yang dibutuhkan sesuai dengan metode pengujian (seperti γ GT, ALP, bilirubin total). Evaluasi khasiat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan penurunan parameter enzim hati dan hasil histopatologi hati pada kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

b. Metode Pengujian

1) Alat, Bahan dan Hewan Uji

- a) Alat: kandang hewan, *sprit* injeksi, sonde oral, alat gelas, alat bedah steril, mikroskop, spektrofotometer dan timbangan
- b) Bahan: sediaan uji, induktor/bahan penginduksi gangguan fungsi hati (misalnya Parasetamol, D-Galactosamine, dan Lipopolisakarida (LPS), Karbon Tetra Klorida (CCl₄)), pembawa yang sesuai dan obat pembanding kontrol positif.
- c) Hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan umur 6-8 minggu (misalnya galur Wistar atau Sprague Dawley).

2) Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar serta pembawa sediaan uji yang bersifat inert.
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji dengan gangguan hati) diberi pakan standar serta pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan bahan penginduksi gangguan hati.

- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji dengan gangguan hati) diberi pakan standar serta bahan penginduksi gangguan hati dalam pembawa sediaan uji yang bersifat inert serta diberi obat pembanding dengan konversi dosis terapi manusia seperti silymarin. Pembawa tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- d) Kelompok perlakuan (hewan uji dengan gangguan hati) diberi pakan standar serta bahan penginduksi gangguan hati dalam pembawa sediaan uji yang bersifat inert serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Induksi Hewan Uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik. Uji pendahuluan dilakukan dengan mengevaluasi parameter kimia darah minimal SGPT dan SGOT dengan peningkatan minimal 2 (dua) kali lipat setiap individu dibandingkan kontrol normal dan hasil uji histopatologi. Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti di atas.

Induksi gangguan hati dapat dilakukan dengan salah satu cara berikut:

- a) Induksi dengan kombinasi D-Galaktosamin dan Lipopolisakarida
Dilakukan induksi menggunakan kombinasi D-Galaktosamin dosis 200-400 mg/kg dan Lipopolisakarida 10 µg/kg secara intraperitoneal 1 kali atau sesuai dengan hasil orientasi pada uji pendahuluan (sampai tercapai keberhasilan dan kestabilan induksi). Metode pengujian ini lebih menggambarkan kondisi kerusakan hati pada manusia.
- b) Parasetamol
Hewan uji diberikan parasetamol dosis 750-2000 mg/kg bb (p.o) yang dilarutkan dalam larutan saline selama 1-3 minggu atau sesuai dengan hasil orientasi pada uji pendahuluan (sampai tercapai keberhasilan dan kestabilan induksi). Keberhasilan induksi dapat dipertahankan dengan tetap memberikan bahan penginduksi dengan memperhatikan survival hewan uji.
- c) CCl₄
Hewan uji diberi CCl₄ dosis 1 mg/kg yang dilarutkan dalam

minyak zaitun (1:1) (p.o) 2 kali seminggu selama 8 minggu atau sesuai dengan hasil orientasi pada uji pendahuluan (sampai tercapai keberhasilan dan kestabilan induksi). Metode pengujian ini kurang menggambarkan kondisi kerusakan hati pada manusia. Keberhasilan induksi dapat dipertahankan dengan tetap memberikan bahan penginduksi dengan memperhatikan survival hewan uji.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Pemberian sediaan uji dilakukan sesuai dengan bahan penginduksi yang digunakan yaitu sebagai berikut:

- a) Pemberian sediaan uji dilakukan pada hari berikutnya selama jangka waktu tertentu sesuai dengan tujuan pemberian berdasarkan referensi atau uji pendahuluan setelah dilakukan induksi dengan kombinasi D-Galaktosamin dan Lipopolisakarida.
- b) Pemberian sediaan uji dilakukan selama 7 (tujuh) hari atau lebih sesuai dengan tujuan pemberian berdasarkan referensi atau uji pendahuluan setelah dilakukan induksi dengan Parasetamol.
- c) Pemberian sediaan uji dilakukan selama selang waktu tertentu sesuai dengan tujuan pemberian berdasarkan referensi atau uji pendahuluan setelah dilakukan induksi dengan CCl₄.

5) Pemeriksaan Parameter

Pemeriksaan parameter utama dilakukan terhadap parameter enzim hati meliputi SGPT, SGOT, dan hasil histopatologi hati yang menunjukkan adanya gambaran kerusakan pada sel hati serta parameter lain yang dibutuhkan sesuai dengan metode pengujian (seperti γ GT, ALP, bilirubin total). Hasil histopatologi hati dilakukan pewarnaan yang sesuai untuk dievaluasi dengan skoring berdasarkan literatur yang valid.

c. Evaluasi

Evaluasi dilakukan terhadap parameter enzim hati yaitu SGPT, SGOT serta hasil histopatologi hati dan pemeriksaan parameter lainnya yang diperlukan sesuai dengan metode pengujian setelah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol. 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.

O. PERBAIKAN STATUS GIZI

1. Patofisiologi

Malnutrisi adalah defisiensi atau kelebihan asupan nutrisi, ketidakseimbangan nutrisi esensial, atau pemanfaatan nutrisi yang terganggu. Malnutrisi dapat dibagi menjadi 2 jenis: *undernutrition* dan *overnutrition*. *Undernutrition* dapat disebabkan karena konsumsi energi, vitamin dan mineral yang kurang adekuat, sementara *overnutrition* disebabkan konsumsi energi dan mikronutrien yang berlebih.

Undernutrition adalah kekurangan konsumsi pangan secara relatif atau absolut untuk periode tertentu dan dapat dibagi menjadi:

- a. *Wasting*/malnutrisi akut, mengindikasikan penurunan berat badan yang baru terjadi. Biasanya terjadi pada orang yang tidak mendapat asupan makanan yang kualitas dan kuantitasnya tidak adekuat dan/atau pernah mengalami sakit yang berkepanjangan atau frekuensinya sering.
- b. *Stunting*/malnutrisi kronik, merupakan hasil dari kekurangan nutrisi kronik atau rekuren. Biasanya berhubungan dengan kemiskinan, kesehatan dan gizi maternal yang buruk, penyakit yang frekuensinya sering dan/atau pemberian makanan dan perawatan awal hidup yang kurang baik.
- c. Malnutrisi akut dan/atau kronik/*underweight*, mengalami *stunting*, *wasting* atau keduanya.
- d. Defisiensi mikronutrien, kekurangan kandungan vitamin dan mineral spesifik.

Overnutrition adalah kelebihan konsumsi pangan untuk periode tertentu. *Overnutrition* terdiri dari kelebihan berat badan dan obesitas.

Mekanisme malnutrisi *undernutrition* berhubungan dengan defisiensi asupan nutrisi dan adanya kondisi peningkatan kebutuhan nutrisi tubuh. Pada kondisi stress atau adanya cedera, tubuh dapat mengambil cadangan protein untuk memproduksi glukosa yang dibutuhkan oleh tubuh sehingga dapat menyebabkan beberapa organ kehilangan cadangan protein. Respon tubuh terhadap stress antara lain kehilangan massa otot, protein tulang dan komponen solid lainnya (kalsium dan fosfat). Secara keseluruhan efek yang terjadi pada tubuh saat stress atau cedera adalah kehilangan protein.

Tubuh beradaptasi terhadap kondisi defisiensi protein tersebut melalui penyimpanan energi bersamaan dengan pertahanan

cadangan protein. Hal tersebut dicapai dengan mengurangi metabolisme basal, mengurangi sekresi faktor anabolik dan meningkatkan hormon katabolik.

Efek dari kehilangan massa sel tubuh dan aktivitas inflamasi pada stress atau cedera mempengaruhi kualitas hidup. Pada manusia lanjut usia dan pasien dengan penyakit kronis, harapan hidup, performa fisik dan kemampuan kognitif secara signifikan menurun bersamaan dengan menurunnya massa otot tubuh. Pada pedoman ini, kelas terapi difokuskan pada keadaan malnutrisi *undernutrition* yang ditujukan untuk perbaikan status gizi.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Dengan menggunakan hewan uji yang sesuai, dilakukan pengujian perbaikan status gizi dengan didahului induksi yang sesuai sehingga menghasilkan hewan uji yang mengalami malnutrisi dengan kriteria *undernutrition*. Hewan uji dianjurkan ditempatkan pada kandang individual.

Hewan uji diberikan sediaan uji selama beberapa waktu tertentu dan dilakukan pemeriksaan beberapa parameter yang dapat mengindikasikan perbaikan nutrisi yang diukur seperti kenaikan berat badan, indeks Lee, rasio efisiensi *food intake/ food efficiency ratio (FER)*, kadar hemoglobin, dan jika diperlukan kadar albumin. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan parameter uji pada kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

b. Metode Uji

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: kandang hewan uji, sonde oral, timbangan, dan peralatan analisa parameter penelitian.
- b) Bahan: sediaan uji, pembawa
- c) Hewan uji: tikus

2) Pengelompokan hewan uji

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

- a) Kelompok kontrol normal, hewan normal yang diberi pakan standar
- b) Kelompok kontrol negatif, hewan yang diinduksi *undernutrition* tetapi tidak diberikan perlakuan apapun.

- c) Kelompok perlakuan, hewan yang diinduksi *undernutrition* dan diberikan sediaan uji minimal tiga kelompok dosis. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

3) Induksi hewan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik. Hewan uji dianjurkan ditempatkan pada kandang individual.

a) Metode induksi dengan pakan diet rendah protein

Hewan uji akan diberi pakan diet rendah protein selama beberapa periode waktu tertentu sejak hewan lepas dari masa sapih untuk menginduksi keadaan *undernutrition*. Dilakukan uji pendahuluan sebagai referensi untuk metode induksi malnutrisi pada studi utama.

Hewan uji pada kelompok kontrol normal diberikan pakan diet standar dengan kandungan protein minimal 12% (yang diberikan *ad libitum* sementara kelompok yang diinduksi *undernutrition*, kandungan protein pakan antara 3-6% atau sesuai dengan hasil uji pendahuluan. Walaupun pakan mengandung defisiensi protein, total kalori pakan harian tetap dipertimbangkan. Diet rendah protein dapat diberikan sebanyak 2,5-5 g/100 g berat badan/hari atau sesuai kebutuhan kalori harian hewan, selama misalnya 8 minggu atau lebih dengan evaluasi berat badan hewan setidaknya setiap minggu. Air minum diberikan *ad libitum*. Diet rendah protein dipertahankan selama periode pemberian sediaan uji atau sesuai dengan hasil orientasi pada uji pendahuluan. Jangka waktu induksi maupun perlakuan lain dapat ditambahkan apabila diperlukan dengan tetap memperhatikan prinsip kesejahteraan hewan.

Ukuran keberhasilan induksi *undernutrition* yaitu terdapat selisih berat badan lebih dari 20% atau berdasarkan statistik bermakna.

b) Metode induksi dengan hipokalori

Hewan uji diberikan pakan dengan gizi kurang dengan protein dan kalori terbatas selama waktu tertentu misalnya 26 hari atau lebih berdasarkan hasil uji pendahuluan.

Air minum diberikan *ad libitum*. Diet rendah protein dan rendah kalori dipertahankan selama periode pemberian sediaan uji atau sesuai dengan hasil orientasi pada uji pendahuluan. Jangka waktu induksi maupun perlakuan lain dapat ditambahkan apabila diperlukan dengan tetap memperhatikan prinsip kesejahteraan hewan.

Ukuran keberhasilan induksi *undernutrition* yaitu terdapat selisih berat badan lebih dari 20% atau berdasarkan statistik bermakna dan hasil pemeriksaan klinisnya.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. Hewan uji diberikan sediaan uji secara peroral sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan setelah dilakukan induksi (sesuai uji pendahuluan). Sediaan uji diberikan setiap hari selama 28 hari atau lebih sesuai dengan tujuan pemberian.

5) Pengukuran parameter penelitian

a) Berat Badan dan Monitoring Intake Pakan

Berat badan hewan uji dimonitor setiap hari sebelum perlakuan harian dan intake pakan juga diukur setiap hari.

Tidak ada batasan restriksi pakan pada seluruh kelompok di fase perlakuan, namun konsumsi pakan akan dimonitor dan direkam setiap hari untuk menentukan perkembangan dan efisiensi makanan. Efisiensi pakan/ Rasio efisiensi *food intake/ Food efficiency ratio (FER)* adalah rasio antara kenaikan berat badan (g) dan intake diet total selama eksperimen (g) x 100.

Food efficiency ratio (FER) = (kenaikan berat badan (g)/ intake pakan (g)) x100.

$$\text{Food efficiency ratio (FER)} = \frac{\text{kenaikan berat badan (g)}}{\text{intake pangan (g)}} \times 100$$

Indeks Lee digunakan untuk pemeriksaan malnutrisi, dihitung dengan membagi akar pangkat tiga berat badan (g) dengan Panjang nasoanal (mm) kemudian dikali 10.

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

b) Analisis Biokimiawi Serum

Dilakukan analisis biokimia serum terhadap kadar Hemoglobin dengan metode yang sesuai. Analisis terhadap kadar albumin dapat dilakukan jika diperlukan dengan metode yang sesuai.

Dilakukan evaluasi terhadap parameter seperti kenaikan berat badan, indeks massa tubuh terhadap Panjang tubuh hewan termasuk Indeks Lee, rasio efisiensi *food intake/ food efficiency ratio (FER)*, kadar Hemoglobin, dan parameter biokimia lain jika diperlukan seperti kadar albumin, pada sebelum diet rendah protein (hari ke-0), sebelum pemberian sediaan uji dan akhir penelitian.

c. Evaluasi

Dilakukan pengukuran terhadap parameter yang diamati. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan pada kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi statistik yang diikuti dengan relevansi pada klinik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek. Apabila tidak memungkinkan dapat tidak menggunakan kelompok kontrol positif.

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

ttd.

PENNY K. LUKITO