

BAB III

TATA KERJA

3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan penelitian ini adalah papan bedah, alat bedah, kandang mencit, pakan mencit, masker, sarung tangan, kapas, timbangan hewan, timbangan analitik (*Wiggen Hauser*), sonde oral, bunsen, pipet tetes, Erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, kaca arloji, spatel, batang pengaduk, kaca objek, mikroskop, *Software AOT425StatPgm* Versi.1.0.

3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat etil p-metoksisinamat, spirtus, *Phosphate buffered formalin*, aquadest, *haemaktosolin-eosin*, Na-CMC 0,5%.

3.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah hewan mencit betina dengan bobot badan rentang 20-30 gram dengan rata-rata usia 6-8 minggu yang diperoleh dari peternakan Institut Teknologi Bandung (ITB) serta memiliki aktivitas normal dan sehat yang sesuai suhu dan kelembabannya.

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Persiapan Hewan Percobaan

Mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama 1 minggu (minimal 5 hari) dengan tujuan menyesuaikan mencit dengan lingkungan yang baru serta meminimalisir efek stress pada mencit yang dapat mempengaruhi penelitian (OECD, 2008).

Mencit yang digunakan dalam percobaan adalah mencit yang sehat dengan ciri-ciri mata merah jernih, bulu tidak berdiri, bertingkah laku normal, mengalami peningkatan berat badan dalam batas tertentu yang diukur secara rutin berdasarkan prinsip 3R yaitu *replacement*, *reduction* dan *refinement*. Mencit ditimbang beratnya secara berkala untuk

mengontrol berat badan. Untuk membedakan masing-masing perlakuan, dilakukan penandaan mencit menggunakan spidol. Mencit diberi makan dengan takaran 5 gram/ekor/hari serta diberi minum secukupnya.

Kondisi ruangan tempat dilaksanakannya percobaan juga dijaga setiap hari. Suhu ruangan diatur pada kisaran $22^{\circ}\text{C} (\pm 3^{\circ}\text{C})$. Kelembaban ruangan berada pada kisaran 50-60%, serta pencahayaan diatur pada 12 jam terang dan 12 jam gelap mengikuti aturan OECD (OECD, 2008).

3.4.2 Persiapan Larutan Uji

Isolat etil p-metoksisinamat dilarutkan dalam larutan Na-CMC 0,5% dengan ketentuan dosis dari OECD 425 yaitu 1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, 1750, 5000 mg/kgBB. Untuk kontrol normal hanya diberi Na-CMC.

3.4.3 Prosedur Kerja Uji Toksisitas Akut

1. Uji Terbatas

Hewan coba dibagi menjadi dua kelompok yaitu kontrol normal dan kontrol bahan uji (isolat etil p-metoksisinamat) data awal bahan uji yang digunakan pada limit test yaitu 5000 mg/kgBB. Sebelum diberikan perlakuan, hewan coba dipuasakan selama 12 jam namun tetap diberikan minum. Pemberian dilakukan melalui oral menggunakan sonde oral. Setelah perlakuan mencit dipuasakan selama 4 jam, tanda toksisitas diamati setiap 30 menit pada 4 jam pertama dengan interval waktu 48 jam. Jika mencit ditemukan mati maka dilanjutkan ke uji utama. Namun, jika mencit masih bertahan hidup atau mati setelah 48 jam, mencit diberikan dosis dan perlakuan yang sama serta dilakukan pengamatan kembali. Jika ditemukan 3 hewan yang hidup dari 5 hewan uji, maka pengujian dihentikan. Namun, jika ditemukan 3 hewan uji mati dari 5 hewan uji maka perlu dilakukan uji utama.

2. Uji Utama (Maint Test)

Hewan uji dipuasakan selama 12 jam namun tetap diberi minum, dibagi menjadi dua kelompok uji yaitu kelompok kontrol normal hanya diberi Na-CMC dan kelompok bahan uji dengan

dosis dari estimasi yaitu 1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, 1750, 5000 mg/kgBB. Pemberian dosis pada hewan uji dengan interval waktu 48 jam, dilakukan pengamatan pada hewan uji selama 14 hari. Jika selama 48 jam hewan masih bertahan hidup maka dosis ditingkatkan dari dosis sebelumnya, apabila hewan uji ditemukan mati atau hampir mati maka dosis diturunkan dari dosis sebelumnya. Uji utama dihentikan hingga uji memenuhi salah satu kriteria :

- a. 3 hewan berturut-turut bertahan di atas batas dosis
- b. 5 pembalikan terjadi pada setiap 6 hewan yang diuji berturut-turut
- c. Jika ditemukan 3 kematian pada 4 konsentrasi yang sama

3.4.4 Pengamatan Hewan Uji

Hewan yang diamati secara individual pada uji utama selama 30 menit pertama setelah dosis diberikan secara berkala selama 48 jam (dengan perhatian khusus diberikan selama 4 jam pertama). Pengamatan untuk total 14 hari, kecuali jika uji sudah memenuhi salah satu kriteria diatas maka pengamatan dihentikan. Pengamatan tanda-tanda toksisitas berupa salivasi, piloereksi (tegang pada bulu), konvulsi (kejang), tremor (gemetar), diare dan kematian. Pembedahan dilakukan untuk melihat pengaruh dari pemberian etil p-metoksisinamat terhadap organ mencit.

3.4.5 Pengambilan Organ

Mencit dibunuh dengan cara dimasukkan ke dalam tabung berisi gas CO₂. Mencit yang sudah benar-benar mati dikeluarkan dari tabung kemudian ditelentangkan pada papan bedah dimana akan dilakukan nekropsi. Kulit perut bagian bawah diangkat dengan pinset dan digunting menggunakan gunting bedah untuk memberikan jalan bagi pembedahan. Pengguntingan dilanjutkan kearah perut atas sisi kanan dan kiri hingga ke bagian bawah kedua kaki depan mencit sehingga seluruh bagian rongga perut mencit terlihat, lalu organ yang diambil adalah hati, lambung dan ginjal.

3.4.6 Pengamatan Makroskopik Organ

Pengamatan makroskopik dilakukan dengan cara menimbang berat basah organ hati, lambung dan ginjal kemudian dibandingkan terhadap bobot organ mencit normal dengan mencit yang diberi bahan uji serta dilihat bentuk fisik organ tersebut.

3.4.7 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan mikroskopik dari organ yang menunjukkan adanya perubahan secara patologi pada hewan yang bertahan hidup selama 24 jam atau lebih setelah pemberian dosis awal dapat dilakukan untuk mendapatkan informasi yang berguna.

Setiap organ hati, lambung, dan ginjal dimasukkan dalam larutan *fixative Phosphate buffered formalin*. Organ tersebut dibuat preparat histologi dengan pewarna *haematoksin-eosin* kemudian diperiksa dibawah mikroskop.

A. Organ Hati

Organ hati yang telah diambil dihari ke-15 dibuat preparat histologi dan diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 400x. Pada tiap preparat histologi hati, diambil 10 lapang pandang dan diamati kerusakan selnya. Kerusakan yang ditemui kemudian diberi skoring untuk mengetahui derajat kerusakannya.

Skoring : 0 : sel tampak normal

1 : terjadi hemoragi

2 : terjadi degenerasi lemak

3 : terjadi nekrosis

B. Organ Lambung

Organ lambung yang telah diambil dihari ke-15 dibuat preparat histologi dan diamati dengan mikroskop perbesaran 100x. Pada tiap preparat histologi lambung, diambil 5 lapang pandang diamati kerusakan selnya. Kerusakan yang ditemui kemudian diberi skoring untuk mengetahui derajat kerusakannya.

Skoring : 0 : tidak ada perubahan patologik

1 : deskuamasi epitel

2 : erosi permukaan epitel

3 : ulserasi epitel

C. Organ Ginjal

Organ ginjal yang telah diambil dihari ke-15 dibuat preparat histologi dan diamati dengan mikroskop perbesaran 400x. Pada tiap preparat histologi ginjal, diambil 30 glomerulus dan diamati kerusakan selnya. Kerusakan yang ditemui kemudian diberi skoring untuk mengetahui derajat kerusakannya.

Skoring : 0 : glomerulus normal

1 : pelebaran kapiler (vasodilatasi)

2 : atrofi glomerulus

3.5 Pengolahan Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan AOT425StatPgm Versi.1.0 untuk menentukan estimasi nilai LD₅₀.