BAB III
TATA KERJA

3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian terdiri dari: Pipet tetes, batang pengaduk, spatel, kaca arloji, gelas ukur *(pyrex®)*, be*cker glass (pyrex®)*, bunsen, erlenmeyer *(pyrex®)*, sonde oral, kandang mencit, *chamber* CO_2, pakan mencit, kapas, masker, sarung tangan, timbangan analitik (ohaus®), papan bedah, alat bedah, pH meter *(ohaus®)*, pisau mikrotom, kaca objek, *cover glass*, mikroskop *(yazumi®), optilab viewers*, *Software standar* AOT425StatPgm.

1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu isolat *soluble* kurkumin, *aquadest*, NaCl 0,9%, *Phosphate buffered formalin*, etanol 70%, pewarna haematokisilin-eosin.

1.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah hewan mencit putih betina *Swiss webster* dengan bobot badan 20-30 gram dengan rata-rata usia 6-8 minggu berasal dari Institut Teknologi Bandung (ITB).

1.4 Metode Penelitian

3.4.1 Persiapan Hewan Percobaan

Mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama 1 minggu dengan tujuan mengadaptasikan mencit dengan lingkungan yang baru serta meminimalisir efek stres 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,mengalami peningkatan berat badan dalam batas tertentu yang diukur secara rutin. Mencit ditimbang beratnya secara berkala untuk mengontrol berat badan. Untuk membedakan masing-masing perlakuan, dilakukan penandaan mencit meggunakan spidol

permanen. Mencit diberi makan dengan takaran pakan 5 gram/ekor/hari serta diberi minum secukupnya.

Kondisi ruangan tempat pelaksanaan percobaan juga dijaga setiap hari. Suhu rungan diatur pada kisaran 22°C (± 3°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 Bahan Uji

Isolat *Soluble* kurkumin dilarutkan dalam larutan akuades sesuai dengan ketentuan dosis dari OECD 425 yaitu 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 1750; 5000 mg/kg bb. Untuk kontrol normal hanya diberi *aquadest.*

3.4.3 Prosedur Kerja Uji Toksisitas Akut Oral *Soluble* Kurkumin Metode OECD 425 UDP

A. Prosedur Kerja

1) Uji Terbatas *(Limit test)*

Hewan coba dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol negatif dan kelompok bahan uji (isolat *soluble* kurkumin) data awal bahan dosis yang digunakan pada *limit test* yaitu 5000 mg/kgBB, dengan data toksisitas akut dari isolat *soluble* kurkumin yaitu >2000mg/kgBB yang daiperoleh dari *Material Safety Data Sheet*. Sebelum di berikan perlakuan, hewan coba dipuasakan selama 12 jam namun tetap diberikan minum. Pemberian dilakukan 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 masih bertahan hidup atau mati setelah 48 jam, mencit di berikan dosis yang sama dan dilakukan pengamatan kembali. Pada pengujian *limit test* digunakan satu hewan terlebih dahulu, jika mencit ditemukan mati maka dilanjutkan ke uji utama *(main test)*, namun jika hewan masih bertahan hidup maka mencit selanjutnya diberikan dosis dengan perlakuan yang sama. Dikonfirmasi jika ada 3 atau lebih hewan uji dari 5 hewan yang diujikan masih hidup maka dihentikan dan langsung diuji histopatologi. Jika ada 3 atau lebih hewan uji yang mati dari 5 hewan

yang diujikan dilakukan uji utama *(main test*). Penggunaan hewan coba pada pengujian menggunakan 1 hewan coba setiap kelompok uji.

2) Uji Utama *(Main test)*

Uji utama *(main test)* dilakukan dengan memperhatikan tingkat dosis dimana terjadi kematian pada uji pendahuluan. Hewan uji dipuasakan selama 12 jam namun tetap diberi minum. Pemberian isolat *soluble* kurkumin dilakukan secara oral dengan dosis dari estimasi LD_{50} yaitu 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 1750; 5000 mg/kgBB. Setelah pemberian sampel isolat *soluble* kurkumin mencit dipuasakan selama 4 jam, tanda toksisitas diamati setiap 30 menit pada 4 jam pertama dengan interval waktu 48 jam. 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. Pengamatan dilakukan selama 14 hari.

Uji utama dihentikan hingga uji memenuhi salah satu kriteria:

a. 3 hewan berturut-turut bertahan di atas batas dosis;
b. 5 pembalikan (*reverse*) terjadi pada setiap 6 hewan yang diuji berturut-turut;
c. Sedikitnya terdapat 4 hewan telah mengalami pembalikan pertama.

B. 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 harus mencakup perubahan kulit dan bulu, mata dan selaput lendir, dan juga pernapasan, peredaran darah, sistem saraf otonom dan tengah, dan aktivitas somatomotor dan pola perilaku. Tanda-tanda toksisitas yang diamati meliputi, bulu, air liur, lesu, kejang *(konvulsi)*, tremor (gemetar), diare, dan mati. Pembedahan

dilakukan untuk melihat pengaruh dari pemberian isolat *soluble* kurkumin terhadap organ mencit betina (BPOM, 2014).

C. Pengambilan Organ

Mencit betina dikorbankan dengan cara dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi gas CO_2, Mencit betina yang sudah benar-benar mati di keluarkan dari tabung kemudian ditelentangkan pada papan bedah. Kulit perut mencit betina diangkat menggunakan pinset kemudian digunting. Setelah itu di bedah dengan hati-hati, diambil bagian organ vital kemudian dicuci dengan NaCl 0,9%, yang akan diamati untuk selanjutnya diamati secara makroskopik dan mikroskopik. Organ kemudian segera ditimbang untuk mendapatkan bobot organ dalam tubuh hewan percobaan.

D. Pemeriksaan Histopatologi

Seluruh hewan (termasuk yang mati selama penelitian maupun yang dimatikan) harus dinekropsi (diotopsi). Semua perubahan patologi dicatat untuk setiap hewan uji. Pemeriksaan 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 seperti hati, lambung, dan ginjal segera dimasukkan dalam larutan *Phosphate buffered formalin* kemudian dibuat preparat histopatologi kemudian diperiksa dibawah mikroskop.

3.5 Pengolahan Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan AOT425StatPgm untuk menentukan estimasi nilai LD_{50}.