

BAB III

TATA KERJA

3.1 Alat

Alat yang digunakan terdiri dari Pipet tetes, batang pengaduk, spatel, kaca arloji, gelas ukur, *beaker glass*, bunsen, erlenmeyer, sonde oral, kandang mencit, pakan mencit, kapas, masker, sarung tangan, timbangan analitik (*Wiggen Hauser*), *chamber CO₂*, papan bedah, alat bedah, pH meter, pisau mikrotom, kaca objek, mikroskop, *Software standar OECD 425 up and down procedure*.

3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu *Stevia rebaudiana* (B.). aquadest, spiritus, *Phosphate buffered formalin*, etanol 70% dan pewarna haematoksin-eosin (HE).

Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit putih galur *Swiss Webster* dengan bobot 20-30 gram, dan berumur rata-rata 6-8 minggu yang berasal dari peternakan Lab Wistar. Mencit yang digunakan hanya mencit yang berjenis kelamin betina.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Persiapan Bahan Uji

Simplisia daun *Stevia rebaudiana* (B.) di infusa dengan pelarut air selama 15 menit dengan suhu 90⁰C dan dibuat sesuai 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 aquadest.

3.3.2 Persiapan Hewan uji

Sebelum dilakukan pengujian hewan uji diaklimatisasi terlebih dahulu selama 1 minggu dengan tujuan agar mencit dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru. Sehingga dapat meminimalisir efek stres pada mencit yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Mencit yang digunakan adalah mencit sehat dengan ciri-ciri bulu tidak berdiri, berwarna putih bersih, mata jernih, bertingkah laku normal, dan

mengalami peningkatan berat badan dalam batas tertentu yang diukur secara rutin, mencit ditimbang beratnya secara berkala untuk mengontrol berat badan. Mencit diberi makan serta diberi minum secukupnya.

Untuk menghindari adanya kekeliruan dalam masing-masing perlakuan, maka mencit diberi tanda dengan menggunakan spidol permanen. Kondisi ruangan tempat dilangsungkannya percobaan juga dijaga setiap hari dan disesuaikan dengan aturan (OECD, 2008) yaitu suhu ruangan diatur pada kisaran $22^{\circ}\text{C} (\pm 3^{\circ}\text{C})$. Kelembaban ruangan berada pada kisaran 50-60%, serta pencahayaan diatur 12 jam terang dan 12 jam gelap.

3.3.3 Prosedur Kerja Uji Toksisitas Akut Produk Teh Daun *Stevia rebaudiana* (B.) Dengan Metode 425 *Up and Down Procedure A*. Prosedur Uji

1) Uji Terbatas (*Limit Test*)

Hewan uji yang digunakan sebanyak 6 ekor dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol negatif menggunakan 1 ekor mencit dan kelompok bahan uji menggunakan 5 ekor mencit. Dosis awal yang digunakan pada *limit test* yaitu 5000 mg/kg bb. Sebelum diberikan perlakuan, hewan uji dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam namun tetap diberikan air minum. Puasa dilakukan untuk meminimalisir pengaruh dari zat-zat yang terdapat dalam makanan yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Pemberian bahan uji dilakukan secara oral menggunakan sonde oral. Setelah perlakuan mencit dipuasakan selama 4 jam, tanda-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 hewan masih bertahan hidup setelah 48 jam, mencit selanjutnya 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 yang mati dari 5 hewan yang diujikan maka perlu dilakukan uji utama.

2) Uji Utama (*Main Test*)

Hewan uji dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam namun tetap diberi minum, kelompok bahan uji dengan dosis awal yang digunakan pada *limit test* yaitu 5000 mg/kgBB. Pemberian dosis berikutnya pada hewan uji ditentukan oleh hasil pengamatan pada hewan sebelumnya 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 maka dosis diturunkan dari dosis sebelumnya. Peningkatan dan penurunan dosis mengikuti ketentuan dosis dari OECD 425 yaitu 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 1750; 5000 mg/kgBB. 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

Pengamatan hewan uji dilakukan secara individual pada uji terbatas dan uji utama selama 30 menit pertama setelah pemberian dosis, diamati secara berkala selama 48 jam dengan perhatian khusus dilakukan selama 4 jam pertama, pengamatan total dilakukan selama 14 hari, kecuali untuk uji utama jika uji sudah memenuhi salah satu kriteria diatas maka pengamatan dihentikan. Parameter tanda toksisitas yang diamati meliputi keadaan piloereksi, konvulsi, tremor, nyeri, mata, refleks daun telinga, adanya salivasi, lakrimasi, dan aktivitas selama 14 hari pengamatan.

Tabel 3.1 Pengamatan Tanda-Tanda Toksisitas

| Tanda-Tanda Toksisitas | Keterangan |
|--------------------------|---|
| Piloereksi | Bulu hewan terlihat keras atau tegak sebagian |
| Konvulsi | Otot-otot hewan mungkin kaku atau lembek. Hal ini berlangsung selama berapa detik atau mungkin lebih lama. Jika kejang berlangsung selama lebih dari satu menit dan diulangi selama 5 kali sehari, maka hewan harus dibunuh |
| Tremor | Hewan dapat menunjukkan otot berkedut atau gerakan kulit yang cepat |
| Nyeri | Hewan yang nyeri akan menyebabkan bagian orbital, melipat daun telinga ke bagian dalam dan menjauhkan kumisnya dari wajah |
| Mata (<i>grooming</i>) | Hewan akan mengeluarkan cairan berwarna merah, yang keluar di dekat matanya. Secara normal, hewan akan melakukan perawatan diri (<i>grooming</i>) dengan cairan ini. |
| Refleks Daun Telinga | Dengan mencubit daun telinga biasanya hewan akan mengguncang kepalanya. Jika tidak ada reflex maka adanya ketidaknormalan |
| Salivasi | Salivasi yang berlebihan atau abnormal ditandai dengan kegagalan untuk menelan merupakan respon terhadap paparan zat uji |
| Lakrimasi | Merupakan peningkatan produksi air mata pada hewan. Cairan merah yang keluar dari matanya mengindikasikan mencit mengalami stress |
| Aktivitas | Merupakan reaksi yang berlebihan akibat adanya sentuhan atau suara. Bisa terjadi akibat ketakutan berlebih atau perubahan neuronal |

C. Pengambilan Organ

Mencit yang sudah diuji kemudian dikorbankan dengan cara menggunakan inhalasi *chamber* CO₂, mencit dimasukkan kedalam *chamber* yang tertutup rapat kemudian dialiri gas CO₂, mencit dibiarkan beberapa waktu hingga mencit mati. Mencit yang telah dipastikan mati dapat dilihat dengan mengamati pernafasan dan gerak perut dari mencit. Mencit dikeluarkan dari *chamber* CO₂, kemudian mencit ditelentangkan pada papan bedah. Kulit perut mencit diangkat menggunakan pinset kemudian digunting. Setelah itu di bedah dengan hati-hati, diambil bagian organ vital yang akan diamati dibersihkan dari lemak yang membungkusnya dan dicuci dengan larutan natrium klorida 0,9% dan selanjutnya diamati secara makroskopik dan ditimbang.

Organ ditimbang menggunakan timbangan analitik untuk mendapatkan bobot organ dalam tubuh hewan percobaan.

E. Pemeriksaan Histopatologi

Seluruh hewan yang diujikan termasuk hewan yang mati saat pengujian maupun hewan yang dikorbankan harus dinekropsi/dibedah dan diperiksa patologinya, kemudian dicatat setiap perubahan yang terjadi pada semua hewan uji. Organ yang menunjukkan adanya perubahan secara patologis pada hewan yang bertahan hidup selama 24 jam atau lebih setelah diberikan dosis awal dilakukan pemeriksaan mikroskopik. Tujuan dilakukannya pemeriksaan mikroskopik untuk mendapatkan informasi yang berguna dan mengetahui ada atau tidaknya perubahan secara patologi yang terjadi pada hewan yang bertahan hidup selama 24 jam atau lebih.

Organ yang diperiksa meliputi seperti lambung, ginjal dan hati dimasukkan kedalam larutan *phosphate buffered formalin* kemudian diperiksa dibawah mikroskop.

F. Pengamatan Makroskopik Organ

Pengamatan makroskopik pada organ hati, lambung dan ginjal dilakukan dengan cara menimbang berat basah masing-masing organ. Kemudian, dibandingkan bobot organ mencit kontrol dengan bobot organ mencit yang diberi perlakuan.

G. Pengamatan Mikroskopik Organ

Pada pengamatan mikroskopik organ yang diperiksa yaitu hati lambung dan ginjal. Pengamatan ini dilakukan untuk mengetahui hubungan antara gejala yang terjadi dengan struktur organ yang mengalami paparan bahan uji. Preparat histologi dibuat dengan cara mengiris organ menggunakan mesin pemotong khusus (mikrotom) kemudian diletakkan diatas kaca objek, kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan Hematoksilin-Eosin (HE), kemudian ditutup dengan kaca objek dan dilem menggunakan entellan. Preparat diamati di bawah mikroskop dan dilakukan pemotretan.

3.4 Pengolahan Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *AOT425StatPgm* versi ke-1 untuk menentukan estimasi nilai LD₅₀.