

## **BAB III**

### **TATA KERJA**

#### **3.1 Alat**

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

#### **3.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan yaitu pakan mencit, isolat katekin, Na CMC, spirtus, Phosphate buffered formalin, pewarna haematoksin-eosin.

Hewan uji yang digunakan adalah hewan mencit putih betina dengan bobot badan 20-30 gram dengan rata-rata usia 6-8 minggu yang diperoleh dari peternakan Intan Berlian.

#### **3.3 Metode**

##### **3.3.1 Persiapan Hewan Percobaan**

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

Mencit yang diikutsertakan dalam percobaan adalah mencit yang sehat dengan ciri-ciri betina tidak sedang hamil, mata merah jernih, bulu tidak berdiri, bertingkah laku normal, mengalami peningkatan berat badan dalam batas tertentu yang diukur secara rutin. Mencit ditimbang beratnya secara berkala untuk mengontrol berat badan. Untuk membedakan masing-masing pelakuan, dilakukan penandaan mencit menggunakan spidol permanen. Mencit betina dipilih karena memiliki sensitivitas lebih tinggi dibandingkan mencit jantan.

Kondisi ruangan tempat dilangsungkannya 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).

### 3.3.2 Persiapan Bahan Uji

Isolat katekin 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. Untuk kontrol normal hanya diberi Na CMC 0,5%.

### 3.3.3 Prosedur Uji Toksisitas Akut Isolat Katekin Gambir Menggunakan Metode OECD 425 Up And Down Procedure

#### A. Prosedur Uji

##### 1) Uji Terbatas

Hewan coba dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol negatif dan kelompok bahan uji (isolat katekin) data awal bahan uji yang digunakan pada limit test yaitu 5000 mg/kg bb, dengan data toksisitas akut dari katekin yaitu 3890 mg/kg yang diperoleh 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. Jika mencit masih bertahan hidup atau mati setelah 48 jam, mencit di berikan dosis yang sama dan dilakukan pengamatan kembali. Dikonfirmasi jika, ada 3 hewan uji yang masih hidup atau mati dari 5 hewan yang di ujikan. Penggunaan hewan coba pada pengujian menggunakan 1 hewan coba setiap kelompok uji.

##### 2) Uji Utama

Hewan uji Dipuasakan selama 12 jam namun tetap diberi minum, dibagi menjadi dua kelompok uji yaitu kelompok kontrol negatif hanya diberi aquadest saja, dan kelompok bahan uji dengan dosis dari uji terbatas yang dilakukan sebelumnya yaitu 1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, 1750, 5000 mg/kg. Pemberian dosis pada hewan uji dengan selang 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 (*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.. Perhatian harus diarahkan untuk pengamatan salivasi, tremor, mata, piloereksi (bulu berdiri), konvulsi (kejang), aktivitas, diare dan mati. Pembedahan dilakukan untuk melihat pengaruh dari pemberian katekin terhadap organ mencit.

#### C. Pengambilan Organ

Mencit dibunuh dengan cara dimasukkan ke dalam tabung CO<sub>2</sub>. Mencit yang sudah benar-benar mati di keluarkan dari tabung kemudian 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 untuk selanjutnya diamati secara makroskopik, mikroskopik dan ditimbang.

#### D. Penimbangan Organ

Organ kemudian segera ditimbang untuk mendapatkan bobot organ dalam tubuh hewan percobaan.

#### E. Pemeriksaan Histopatologi

Seluruh hewan (termasuk yang mati selama penelitian maupun yang dimatikan) harus dinekropsi. 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 dengan menggunakan pewarna preparat haematokisilin-eosin kemudian diperiksa dibawah mikroskop.

### **3.4 Pengolahan Data**

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan AOT425StatPgm untuk menentukan estimasi nilai LD<sub>50</sub>.