

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, erlenmeyer, sonde oral, kandang mencit, *chamber CO₂*, kapas, masker, sarung tangan, timbangan analitik (*Wiggen Hauser*), 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 isolat alfa gamma sodium mangostin, aquadest, pakan mencit, *Phosphate buffered formalin*, etanol 70%, pewarna haematokisilin-eosin.

Hewan uji yang digunakan adalah hewan mencit putih betina galur *Swiss webster* dengan bobot badan 20-30 gram.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Persiapan Hewan Uji

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 mata merah jernih, bulu tidak beridiri, 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 diberi makan dengan takaran pakan 5 gram/ekor/hari serta diberi minum secukupnya.

Ruangan yang digunakan untuk percobaan hendaknya memenuhi persyaratan, yaitu suhu ruangan diatur pada kisaran 22°C (\pm 3°C). Kelembaban ruangan berada pada kisaran 50 – 60%, serta pencahayaan diatur yaitu 12 jam terang dan 12 jam gelap (OECD, 2008).

3.3.2 Persiapan Larutan Uji

Isolat alfa gamma sodium mangostin dilarutkan dalam aquadest sesuai dengan ketentuan dosis dari OECD 425 yaitu 1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, 1750, 5000. Untuk kontrol normal hanya diberi aquadest.

3.3.3 Prosedur Kerja Uji Toksisitas Akut

A. Uji Terbatas

Hewan coba dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol negatif dan kelompok uji (isolat alfa gamma sodium mangostin) data awal bahan uji yang digunakan pada limit test yaitu 5000 mg/kg bb. Sebelum di berikan perlakuan, hewan coba dipuasakan selama 12 jam namun tetap diberikan minum. Pemberian dilakukan secara 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. 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.

B. 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 uji dengan dosis dari LD₅₀ yaitu 1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, 1750, 5000. 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:

1. 3 hewan berturut-turut bertahan di atas batas dosis;

2. 5 pembalikan (*reverse*) terjadi pada setiap 6 hewan yang diuji berturut-turut;
3. Sedikitnya terdapat 4 hewan telah mengalami pembalikan pertama.

3.3.4 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 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. Perhatian harus diarahkan untuk pengamatan tremor, kejang, air liur, diare, lesu, tidur dan koma. Pembedahan dilakukan untuk melihat pengaruh dari pemberian isolat alfa gamma sodium mangostin terhadap organ mencit.

3.4 Pengamatan Histopatologi Organ

3.4.1 Pengambilan Organ Mencit

Mencit dibunuh dengan cara dimasukkan ke dalam tabung CO₂. 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 dan ditimbang.

3.4.2 Penimbangan Organ

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

3.4.3 Pengamatan 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 kemudian diperiksa dibawah mikroskop.

3.5 Analisis Data

3.5.1 Penentuan Nilai LD₅₀

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan program AOT425StatPgm untuk menentukan nilai LD₅₀.

3.5.2 Gambaran mikroskopis

Preparat histopatologi dikirim ke Unit Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin untuk dikonsultasikan dengan ahli patologi anatomi. Pengamatan mikroskopis dilakukan oleh peneliti sendiri. Skoring derajat histopatologi hepar yang digunakan adalah sebagai berikut:

A. Organ Hati

Organ hati dibuat preparat histologi kemudian diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 100x. Diambil 10 lapang pandang pada tiap preparat histologi hati kemudian diamati kerusakan selnya. Nilai skoring diberikan untuk mengetahui derajat kerusakan yang ditemukan.

Skoring:

0: tidak terdapat degenerasi lemak sel pada hati

1: terjadi pendarahan (hemoragi)

2: terjadi degenerasi lemak

3: terjadi nekrosis

B. Organ Lambung

Organ lambung dibuat preparat histologi dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x. Diambil 5 lapang pandang di tiap preparat histologi lambung untuk mengamati kerusakan selnya. Nilai skoring diberikan untuk mengetahui derajat kerusakan yang ditemukan.

Skoring:

0: tidak ada perubahan patologik

1: deskuamasi epitel

2: erosi permukaan epitel

3: ulserasi epitel

C. Organ Ginjal

Organ ginjal dibuat preparat histologi dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x. Diambil 30 glomerulus pada tiap preparat dan diamati kerusakan selnya. Nilai skoring diberikan untuk mengetahui derajat kerusakan yang ditemukan.

Skoring:

0: glomerulus normal

1: degenerasi lemak

2: atrofi glomerulus

3: edema glomerulus