

MODUL PRAKTIKUM

FARMAKOLOGI DAN TOKSIKOLOGI



Direvisi oleh:

apt. Karmelia Intany Doko, M.Pharm.

apt. Chotijatun Nasriyah, M.Farm.

Tim Lab. Farmakologi-Toksikologi

Program Studi Farmasi STIKES Notokusumo

LABORATOROUM FARMAKOLOGI-TOKSIKOLOGI

PROGRAM STUDI S1 FARMASI

SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NOTOKUSUMO YOGYAKARTA

2026

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan kemudahan sehingga buku *Petunjuk Praktikum Farmakologi dan Toksikologi* ini dapat diselesaikan. Buku ini disusun sebagai panduan bagi mahasiswa dalam memahami dan melaksanakan praktikum yang merupakan bagian dari mata kuliah Farmakologi dan Toksikologi.

Modul praktikum farmakologi dan toksikologi ini digunakan sebagai panduan untuk praktikum farmakologi dan toksikologi dengan menggunakan hewan coba di dalam laboratorium. Harapan dibuatnya modul praktikum ini, agar mahasiswa dapat mengaplikasikan dasar farmakologi yang didapat dalam pembelajaran di kelas ke dalam praktik laboratorium, yang hasil akhirnya diharapkan dapat mengaplikasikan ke dalam uji pre-klinik. Untuk memperdalam pemahaman, mahasiswa disarankan untuk merujuk pada buku-buku referensi yang tercantum dalam daftar pustaka, serta sumber-sumber lain, baik dari literatur cetak maupun digital.

Kami menyadari bahwa buku ini masih memiliki kekurangan, oleh karena itu, kami sangat mengapresiasi masukan dan saran dari para pembaca untuk penyempurnaan pada edisi mendatang.

Yogyakarta, 26 Februari 2026

Penulis

PERATURAN DAN TATA TERTIB

A. PERATURAN

1. Praktikan yang berhalangan mengikuti praktikum, **wajib** memberi keterangan tertulis selambat-lambatnya tiga hari setelah hari praktikum, sedangkan untuk yang berhalangan akibat hal-hal yang terencana **wajib** memohon izin selambat-lambatnya 3 hari sebelum hari praktikum.

B. TATA TERTIB

1. Setiap **Kelompok Praktikum** dibagi menjadi **3 Subkelompok**.
2. Praktikan **wajib** berada di laboratorium 15 menit sebelum praktikum dimulai, untuk mempersiapkan peralatan yang diperlukan.
3. Praktikan yang terlambat 15 menit setelah praktikum dimulai tidak diperkenankan mengikuti praktikum, kecuali ada alasan yang dapat dipertanggungjawabkan dan dapat diterima.
4. Praktikan **wajib** memakai jas praktikum selama kegiatan praktikum di laboratorium.
5. Pada saat praktikum, praktikan **wajib** berpakaian rapi dan sopan, tidak memakai sandal, sepatu tidak boleh diinjak, serta rambut diatur sedemikian rupa sehingga rapi. Kuku **wajib** dipotong pendek dan tidak diperkenankan memakai cat kuku.
6. Praktikan yang meninggalkan praktikum sebelum waktu praktikum habis, **wajib** meminta izin kepada dosen atau asisten dosen yang bertugas dengan alasan yang dapat dipertanggungjawabkan dan dapat diterima.
7. Praktikan **wajib** memperlakukan hewan coba dengan bijaksana, memelihara peralatan laboratorium, menghemat bahan dan memelihara kebersihan laboratorium.
8. Selesai praktikum, meja praktikum dan semua peralatan laboratorium yang digunakan **wajib** dibersihkan dan dikembalikan ke tempat semula.
9. Sebelum percobaan:
 - a. memahami prosedur percobaan dan mekanisme kerja obat
 - b. menyiapkan tugas laporan sementara, meliputi: **JUDUL, TUJUAN, DASAR TEORI, CARA KERJA** dan **PUSTAKA ACUAN CARA KERJA** (perseorangan, singkat, dan jelas) di lembar terpisah.
 - c. mengerjakan *pretest* materi praktikum
 - d. praktikan **wajib** mengumpulkan laporan akhir praktikum yang meliputi: **JUDUL, TUJUAN, DASAR TEORI, CARA KERJA, HASIL PENGAMATAN, PEMBAHASAN** dan **PUSTAKA ACUAN**. Laporan akhir dikumpulkan sebelum praktikum berikutnya dimulai.
10. Sebelum pemberian obat, meminta paraf asisten volume pemberian.
11. Mengikuti diskusi sub-kelompok untuk membuat pembahasan praktikum yang berlangsung.
12. Data kelompok hasil percobaan adalah partisipasi semua yang terlibat dalam ketepatan dalam penimbangan, konsentrasi obat, volume dan cara pemberian. Ketidakseriusan dalam bekerja akan mengurangi validitas hasil kerja.
13. Semua mahasiswa wajib menjaga ketertiban dan ketenangan dalam proses praktikum. Aturan laboratorium perihal kebersihan: tanggung jawab alat; kehadiran; tepat waktu;

pindah kelompok; dan ketertiban di laboratorium sesuai aturan Prodi Farmasi Stikes Notokusumo. Apabila terjadi kerusakan alat, menjadi tanggung jawab peminjam.

14. Bila tidak mengikuti 2 percobaan, mahasiswa tidak dapat mengikuti responsi.
15. Hal-hal yang belum diatur dalam ketentuan ini akan diatur kemudian pada waktu pelaksanaan praktikum.

PENILAIAN

Basis Evaluasi	Komponen Evaluasi	Bobot	Deskripsi
1. Aktivitas Partisipatif	Observasi aktivitas mahasiswa	10	Kehadiran dan aktivitas setiap mahasiswa dinilai dalam praktikum
	Partisipasi aktif	15	Keaktifan mahasiswa dalam diskusi
2. Hasil proyek	Laporan akhir	30	Laporan akhir praktikum
3. Kognitif/ Pengetahuan	<i>Pretest</i> dan tugas	20	<i>Pretest/ posttest</i> dilaksanakan setiap acara praktikum
	Laporan sementara	0	Prasyarat mengikuti praktikum.
	Responsi	25	Ujian responsi akhir praktikum
TOTAL		100	

Yogyakarta, 26 Februari 2026
 Koordinator Mata Kuliah Praktikum
 Farmakologi dan Toksikologi



apt. Karmelia Intany Doko, M.Pharm.

JADWAL PRAKTIKUM FARMAKOLOGI DAN TOKSIKOLOGI
SEMESTER GENAP 2025/2026

BULAN	SENIN	SELASA	RABU	KAMIS	JUMAT	KETERANGAN
Maret	9	10	11	12	13	
	16	17	18	19	20	AP
	23	24	25	26	27	
	30	31				
April			1	2	3	
	6	7	8 (K1-K2)	9 (K3-K4)	10	P1-P2
	13	14	15	16	17	
	20	21	22	23	24	UTS
	27	28	29 (K1-K2)	30 (K3-K4)		P3-P4
Mei					1	
	4	5	6	7	8	
	11	12 (K3-K4)	13 (K1-K2)	14	15	P5-P6
	18	19	20	21	22	
	25 (K1-K2)	26 (K3-K4)	27	28	29	P7-P8
Juni	1	2	3	4	5	
	8	9	10 (K1-K2)	11 (K3-K4)	12	P9-P10
	15	16	17	18 (K1-K2)	19 (K3-K4)	RP
	22	23	24	25	26	Minggu Tenang
	29	30				UAS

PELAKSANA TUGAS DOSEN DAN ASISTEN JAGA

HARI	RABU		KAMIS	
KELOMPOK/ GOL PRAKT	1	2	3	4
JAM	07.30-11.30	12.00-16.00	07.30-11.30	12.00-16.00
DOSEN	apt. Karmelia Intany Doko, M.Pharm.			apt. Chotijatun Nasriyah, M.Farm.
ASDOS	Livia Kanaya	Juniar Tresia W. T.	Ridho Pangestu K.	Livia Kanaya
	Ridho Pangestu K.	Adelia Dwi Y.	Sanju Agave G.	Ridho Pangestu K.

Yogyakarta, 26 Februari 2026

Koordinator Mata Kuliah



apt. Karmelia Intany Doko, M.Pharm.

NUPTK. 5441774675230262

ACARA PRAKTIKUM

Minggu	Mata Acara	Materi
I	Asistensi	1. Penjelasan tata tertib praktikum dan responsi 2. Latihan perhitungan dosis dan konversi dosis hewan-manusia
II	Percobaan 1	Dasar-dasar farmakologi
	Percobaan 2	Pengaruh cara pemberian obat analgetik berbagai rute terhadap aktivitas obat
III	Percobaan 3	Efek antiinflamasi
	Percobaan 4	Pengujian aktivitas obat antiinflamasi pada hewan uji
IV	Percobaan 5	Efek penurunan gula darah
	Percobaan 6	Uji aktivitas obat antidiabetes pada hewan uji
V	Percobaan 7	Pengujian aktivitas obat stimulansia (sintetis)
	Percobaan 8	Uji aktivitas obat stimulansia <i>Nigella sativa</i> (OT)
VI	Percobaan 9	Uji toksisitas akut
	Percobaan 10	Tolak ukur kualitatif toksisitas
VII	Responsi	Responsi tertulis dan praktik

PENDAHULUAN

Terkait metode pemberian dan cara kerja dengan hewan percobaan dapat merujuk pada literatur yang relevan. **Dalam praktikum ini, setiap kelompok perlakuan menggunakan 3 ekor hewan uji dengan tujuan untuk meminimalkan jumlah hewan uji.**

Berikut cara perhitungan konversi dosis.

Contoh perhitungan:

Dosis terapi harian parasetamol pasien 70kg = 2.000mg. Berapa perkiraan dosis untuk tikus pada penelitian efek analgetika?

Jawab:

konversi dosis manusia 70kg ke tikus 200g = 0,018 (lihat **Tabel 1**).

$$\begin{aligned}\text{Dosis untuk tikus 200g} &= 0,018 \times 2.000\text{mg} \\ &= 36\text{mg}/200\text{g BB} \\ &= 180\text{mg}/\text{kgBB}\end{aligned}$$

Tabel 1. Konversi perhitungan dosis antar jenis hewan (Lawrence & Bacarach, 1964)

	Mencit 20g	Tikus 200g	Marmot 400g	Kelinci 1,5kg	Kucing 2kg	Kera 4kg	Anjing 12kg	Manusia 70kg
Mencit 20g	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12kg	0,008	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Diambil dari: D.R. Laurance & A.L. Bacharach, Evaluation of Drug Activities: Pharmacocinetics, 1964

Dosis pemberian tersebut diatur volumenya agar tidak melebihi volume maksimum!

Catatan: dalam suatu penelitian, pemberian dosis pada hewan uji sebaiknya dilakukan dengan berpedoman pada orientasi dosis. Sebagai tahap awal orientasi, hasil konversi **dosis harian** manusia (bukan dosis terbagi) ke hewan uji, seperti yang dicontohkan di atas, dapat digunakan sebagai dasar perhitungan orientasi.

Tabel 2. Volume Maksimum Larutan Obat yang Diberikan pada Binatang

Hewan Uji	Volume Maksimum (ml) untuk Tiap Rute Pemberian				
	i.v.	i.m.	i.p.	s.c.	p.o.
Mencit 20-30g	0,5	0,05	1,0	0,5 – 1,0*	1,0
Tikus 100-200g	1,0	0,1	2 – 5,0	2 – 5,0*	5,0
Hamster 50g	-	0,1	1 – 5,0	2,5	2,5
Marmot 250g	-	0,25	2 – 5,0	5,0	10,0
Merpati 300g	2,0	0,5	2,0	2,0	10,0
Kelinci 2,5kg	5 – 10,0	0,5	10 – 20,0	5 – 10,0	20,0
Kucing 3kg	5 – 10,0	1,0	10 – 20,0	5 – 10,0	50,0
Anjing 5kg	10 – 20,0	5,0	20 – 50,0	10,0	100,0

*distribusikan ke daerah yang lebih luas

Diambil dari: M. Bourcard, *et al.*, Pharmacodynamic, Guide de travaux pratiques, 1981-1982

Rumus dosis/volume/konsentrasi obat pemberian pada hewan uji (satuan setara).

$$D \times BB = C \times V$$

Dimana:

- D = dosis (mg/gBB)
- BB = berat badan (gBB)
- C = kadar obat/ konsentrasi (mg/ml)
- V = volume pemberian (ml)

SOAL:

1. Bila suatu obat A hendak diberikan pada tikus 250g dengan dosis 500 mg/kgBB p.o. dan konsentrasi larutan 5% b/v. Berapa volume obat yang diberikan?
2. Apakah konsentrasi sediaan no. 1 dapat diberikan pada tikus secara i.v.? Bila tidak, berapa konsentrasi yang sebaiknya dibuat?

PUSTAKA ACUAN

- Donatus, I.A. 2005. *Toksikologi Dasar*. Edisi II. Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada: Yogyakarta
- Laurance, D.R. & Bacharach, A.L. 1964. Evaluation of Drug Activities. *Pharmacometrics*.

PENGANTAR EKSPERIMEN FARMAKOLOGI

A. Pendahuluan

Mencit merupakan hewan yang paling luas penggunaannya dalam eksperimen di bidang medik, kimia, farmakologi, toksikologi, biologi, dan genetik. Bahan kimia, senyawa, obat, antibodi, serta agen lainnya dapat dievaluasi aktivitas biologisnya dengan cara diberikan pada mencit. Pengetahuan akan metode dan Teknik pemberian obat, deposisi, dan Nasib obat dalam tubuh mencit akan membantu peneliti dalam memilih rute yang paling tepat sesuai tujuan penelitian. Rute pemberian sangat bergantung pada sifat senyawa dan tujuan penelitian. Semua pemberian senyawa uji harus didasarkan pada pengetahuan akan karakteristik kimia dan fisiknya. Setiap rute memiliki kelebihan dan kekurangan, seperti dalam hal absorbs, bioavailabilitas, dan metabolisme senyawa. Pertimbangan dalam pemilihan rute meliputi pH, viskositas, konsentrasi, sterilitas, pirogenitas, iritasi dan toksisitas, adanya senyawa yang membahayakan dan kesejahteraan hewan. Mencit harus dihindarkan atau diminimalkan dari nyeri, penderitaan, dan bahaya jangka panjang. Oleh karenanya mencit harus dikekang dengan Teknik yang tepat. Personel yang melakukan eksperimen hewan juga harus terlatih dalam penanganan dan pengekangan hewan coba. Pada akhirnya, rute pemberian, metode, jumlah dan jenis senyawa yang disuntikkan harus disesuaikan dengan rekomendasi Komisi Etik Penelitian Hewan Coba dan penelitian harus memperoleh Sertifikat Kelaikan Etik Penelitian pada Hewan Coba (Hirota dan Shimizu, 2012).

B. Pemilihan Hewan Uji

Pemilihan hewan uji sangat penting dalam menunjang pelaksanaan pembelajaran praktikum di laboratorium maupun penelitian. Klasifikasi hewan uji berdasarkan tujuan penggunaan hewan uji sebagai berikut:

1. *Exploratory* (penyelidikan): hewan uji digunakan untuk memahami mekanisme biologis, apakah termasuk mekanisme dasar yang normal atau mekanisme yang berhubungan dengan fungsi biologis yang abnormal.
2. *Explanatory* (penjelasan): hewan uji digunakan untuk memahami lebih banyak masalah biologis yang kompleks.
3. *Predictive* (perkiraan): hewan uji digunakan untuk menentukan dan mengukur akibat dari perlakuan, apakah sebagai cara untuk pengobatan penyakit atau untuk memperkirakan tingkat toksisitas suatu senyawa kimia yang diberikan.

Respon yang digunakan oleh suatu senyawa sering bervariasi yang berbeda dan hewan yang sama. Oleh karena itu hewan uji yang akan digunakan dipilih berdasarkan umur, jenis kelamin, berat badan, kondisi Kesehatan dan keturunan. Hewan uji yang digunakan harus selalu berada dalam kondisi dan tingkat Kesehatan yang baik, dalam hal ini hewan uji yang digunakan dikatakan sehat bila pada periode pengamatan bobot badannya bertambah tetap atau berkurang tidak lebih dari 10% serta tidak ada kelainan dalam tingkah laku dan harus diamati satu minggu dalam laboratorium atau pusat pemeliharaan hewan sebelum ujinya berlangsung.

Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan uji, harus menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu: **replacement, reduction dan refinement**.

1. **Replacement** adalah banyaknya hewan percobaan yang perlu digunakan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari penelitian sejenis yang sebelumnya,

maupunn literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Replacement* terbagi menjadi dua bagian, yaitu: relatif (sebisanya mungkin mengganti hewan percobaan dengan memakai organ/ jaringan hewan dari rumah potong atau hewan dari ordo lebih rendah) dan absolut (mengganti hewan percobaan dengan kultur sel, jaringan, atau program komputer).

2. **Reduction** diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian seminimal mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimal biasa dihitung menggunakan rumus Frederer yaitu $(n-1)(t-1) > 15$, dengan n adalah jumlah hewan yang diperlukan. Kelemahan dari rumus ini adalah semakin sedikit kelompok penelitian, semakin banyak jumlah hewan yang diperlukan, serta sebaliknya. Untuk mengatasinya, diperlukan penggunaan desain statistic yang tepat agar didapatkan hasil penelitian yang sah.
3. **Refinement** adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (humane), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian.

Pada prinsipnya jenis hewan yang digunakan untuk uji farmakodinamik sebaiknya adalah hewan model yang sudah teruji (*established*). Bila hewan model ini belum ada, maka pemilihan jenis hewan harus mempertimbangkan sensitifitas, cara metabolisme sediaan uji yang serupa dengan manusia, serta mudah tidaknya penanganan saat pengujian. Hewan pengerat merupakan jenis hewan yang memenuhi persyaratan tersebut di atas, sehingga paling banyak digunakan pada uji farmakodinamik. Hewan yang digunakan harus diketahui asal perolehan, jenis dan galur, jenis kelamin, usia, berat badan, dan harus sehat. Biasanya digunakan hewan dengan variasi bobot tidak lebih dari 20% serta belum pernah digunakan dalam pengujian lain. Adapun kriteria hewan yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kriteria hewan uji digunakan dalam uji farmakodinamik

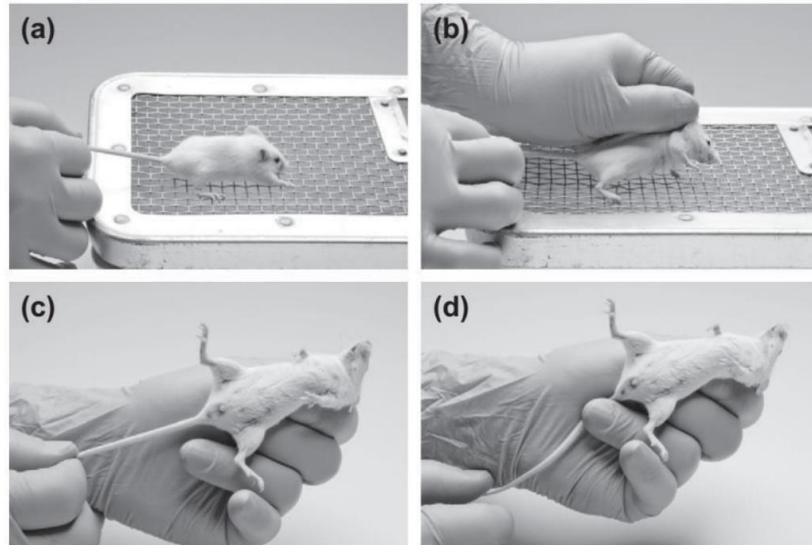
No.	Jenis Hewan	Bobot Minimal	Rentang Umur
1.	Mencit	20 g	6 – 8 minggu
2.	Tikus	120 g	6 – 8 minggu
3.	Marmut	250 g	4 – 5 minggu
4.	Kelinci	1800 g	8-9 bulan

C. Penanganan dan Pengekangan Hewan Uji

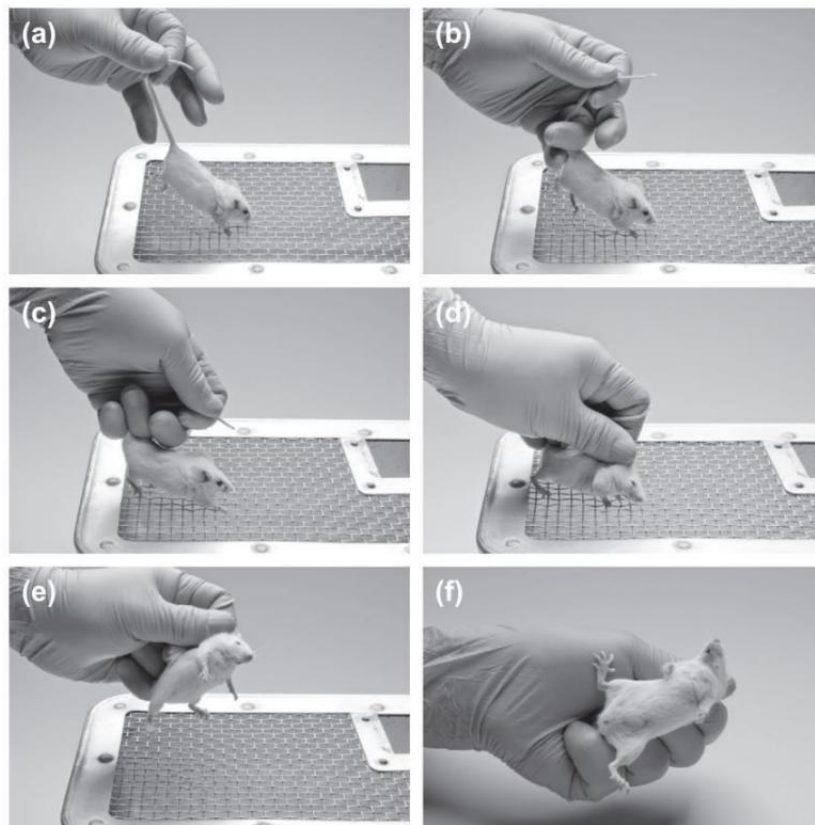
1. Mencit

Mencit (*Mus musculus*) adalah hewan coba yang mudah ditangani. Ia bersifat penakut, fotofobia, cenderung berkumpul sesamanya, serta lebih aktif di malam hari dari pada siang hari. Aktivitas mencit dapat terganggu dengan keberadaan manusia. Suhu tubuh normal 37,4°C dan laju respirasi normal 163 kali per menit. Mencit berbeda dengan tikus, dimana ukurannya mini, berkembang biak sangat cepat, dan 99% gennya mirip dengan manusia. Oleh karena itu mencit sangat representative jika digunakan sebagai model penyakit genetik manusia (bawaan). Selain itu, mencit juga sangat mudah untuk direkayasa genetiknya sehingga menghasilkan model yang sesuai untuk berbagai macam penyakit manusia. Mencit juga lebih menguntungkan dalam hal kemudahan penanganan, tempat penyimpanan, serta harganya relatif lebih murah.

Penanganan dan pengekangan yang baik merupakan hal yang paling penting dalam mencapai pemberian yang tepat. Pengekangan terkait dengan kesuksesan pemberian senyawa. Praktikan sebaiknya mengenakan srung tangan karena pengekangan manual digunakan untuk injeksi. Ada dua macam Teknik pengekangan, yaitu satu tangan dan dua tangan (Hirota dan Shimizu, 2012).



Gambar 1. Teknik pengekangan dua tangan. (a) Mencit diletakkan di atas tutup kandang, satu tangan menarik ekor ke belakang dengan perlahan. (b) Mencit dengan cepat dan kuat diambil pada bagian tengkuk leher di belakang telinga menggunakan ibu jari dan jari telunjuk dari tangan lainnya. (c) Ekor dipindahkan dari tangan yang satu ke daerah antara telapak dan jari manis kemudian dipegang dengan kuat. (d) Mencit terkekang (Hirota dan Shimizu, 2012).

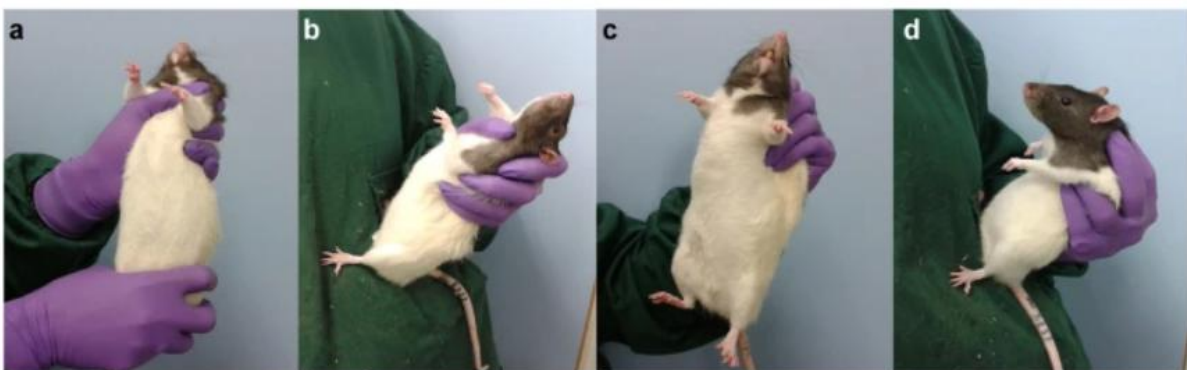


Gambar 2. Teknik pengekangan satu tangan. (a) Ekor diambil menggunakan ibu jari dan jari telunjuk sari satu tangan. (b) Mencit diletakkan di atas tutup kendang dan ditarik perlahan ke belakang. (c) Ekor dengan cepat digenggam di antara telak denagn jari tengah/jari manis/jari kelingking lalu pegangan ekor di antara ibu jari dan jari telunjuk dilepaskan. (d) dan (e) Lipatan kulit pada tengkuk leher sehera digenggam menggunakan ibu jari dan jari telunjuk. (f) Mencit terkekang (Hirota dan Shimizu, 2012).

2. Tikus

Tikus (*Ratus norvegicus*) tidak begitu fotofobik dibandingkan dengan mencit dan kecenderungan untuk berkumpul sesamanya sangat kurang. Selain itu tikus merupakan hewan yang cerdas, mudah ditangani dan relatif resisten terhadap infeksi. Aktivitasnya tidak begitu terganggu dengan adanya manusia di sekitarnya. Bila diperlakukan kasar dan atau makanan kurang, tikus menjadi galak/liar dan sering menyerang si pemegang. Suhu tubuh normal 37,5 - 38°C dan laju respirasi normal 210 kali per menit. Tikus adalah hewan yang pandai dan responnya baik bila dipegang dengan baik pula, serta tidak akan menyerang kecuali merasa terancam atau diprovokasi. Penggunaan sarung tangan selain mengurangi risiko alergi, juga menghindari paparan feromone dan senyawa kimia lain yang dapat menyebabkan tikus gugup.

Tikus dapat diperlakukan sama seperti mencit, namun harus diperhatikan bahwa sebaiknya bagian ekor yang dipegang adalah bagian pangkal ekor. Tikus dapat diangkat dengan memegang perutnya ataupun dengan cara diangkat dari kandangnya dengan memegang tubuhnya/ekornya dari belakang, kemudian diletakkan di atas permukaan kasar. Tikus dipegang dengan tangan kiri dengan cara menjepit leher pada bagian tengkuk dengan jari Tengah dan telunjuk, dan ibu jari diselipkan ke depan untuk menjepit kaki depan tikus, sedangkan jari manis dan kelingking menjepit kaki kiri depan tikus, tangan kanan tetap memegang ekor tikus. Untuk melakukan pemberian obat secara intraperitoneal atau intramuscular, tikus dipegang pada bagian belakang badannya. Hal ini hendaklah dilakukan dengan mulus tanpa ragu-ragu. Tikus tidak mengelak apabila dipegang dari atas, tetapi bila dipojokkan ke sudut, akan akan menjadi panik dan menggigit.



Gambar 3. Demonstrasi teknik pengekangan tikus. (a) metode pengekangan 2 orang; (b) metode pengekangan 1 orang; (c) menjepit tengkuk; (d) metode yang dimodifikasi

3. Kelinci

Kelinci (*Cuniculus forma domestica*) jarang bersuara, hanya dalam keadaan nyeri luar biasa atau stress berat biasanya akan bersuara dan pada umumnya cenderung untuk berontak apabila merasa keamanannya terganggu. Suhu rektas kelinci sehat adalah antara 38,5 – 40°C, pada umumnya 39,5°C. suhu rektal ini berubah apabila

hewan tersebut tereksitasi, ataupun karena gangguan lingkungan. Laju respirasi kelinci dewasa normal adalah 38 – 65 kali per menit. Pada umumnya 50 kali per menit (pada kelinci muda, laju ini dipercepat, dan pada kelinci bayi bisa mencapai 100 kali per menit).

Kelinci harus diperlakukan dengan halus namun sigap karena cenderung untuk berontak. Menangkap atau memperlakukan kelinci jangan dengan mengangkatnya pada telinga karena dapat mengganggu pembuluh darah dan saraf. Kulit pada leher kelinci dipegang dengan tangan kiri dan bagian belakangnya diangkat dengan tangan kanan, lalu badannya didekapkan ke dekat tubuh.



(a)



(b)



(c)



(d)

Gambar 4. Berbagai metode pengekangan kelinci. (a) C Hold; (b) Arm Arm Elbow Hold; (c) Tancing; (d) Burrito

D. Cara mengorbankan Hewan Uji

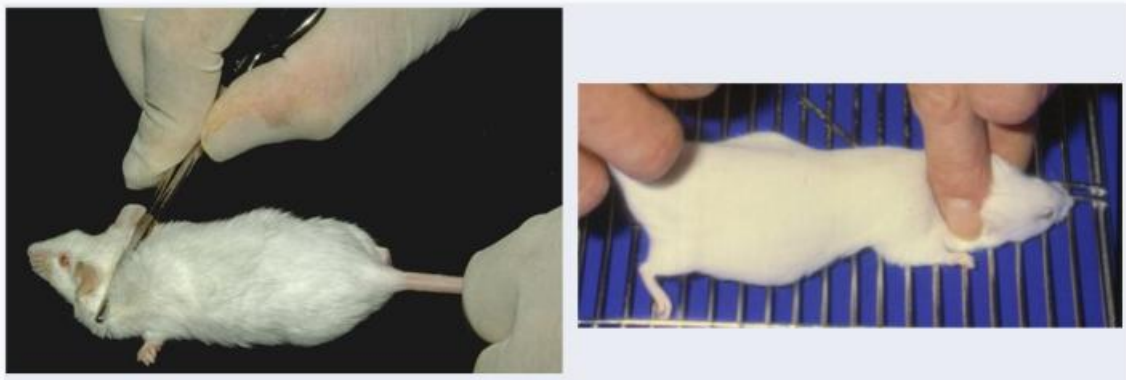
Setelah percobaan, hewan uji tersebut perlu dimusnahkan atau dikorbankan. Pada prinsipnya hewan uji dimusnahkan/dikorbankan sesuai dengan kaidah-kaidah cara dan teknik pengorbanan hewan sesuai Deklarasi Helsinki (2008) dan *American Medical Association* (2020), dengan tahapan sebagai berikut:

1. Prinsip euthanasia

Sebelum hewan uji dikorbankan, dilakukan anestesi terlebih dahulu. Hewan dipegang secara hati-hati tanpa menimbulkan rasa takut, lalu hewan dikorbankan dengan salah satu teknik di tempat terpisah dari hewan lain, dan dijaga agar tidak ada hewan hidup disekitarnya. Euthanasia harus dilakukan oleh personil yang kompeten, dan disertai proses konfirmasi untuk memastikan kematian.

2. Mengorbankan hewan uji dengan salah satu cara berikut:

- a. Dislokasi leher untuk hewan kecil seperti mencit/tikus (dengan berat badan kurang dari 200 gram).



Gambar 5. Dislokasi leher mencit

- b. Cara anestesi secara inhalasi dengan obat bius *halogenated* (seperti halothane, isoflurane, sevoflurane) atau CO₂ (menggunakan *chamber* khusus). Penggunaan eter untuk anestesi dan euthanasia tidak direkomendasikan.
- c. Cara anestesi dengan metode penyuntikan. Metode dengan penyuntikan obat bius dapat dilakukan menggunakan dosis yang disarankan untuk euthanasia (dosis letal) misalnya dengan ketamine dan xylazine, urethane atau pentobarbital.
- d. Cara pengeluaran darah (eksanguinasi) melalui vena jugularis atau arteri karotis yang sebelumnya dianestesi terlebih dahulu.

PERCOBAAN 1

DASAR-DASAR EKSPERIMEN FARMAKOLOGI

Tujuan:

1. Mahasiswa mampu menjelaskan cara penanganan hewan uji.
2. Mahasiswa mampu mengenal karakteristik hewan uji.
3. Mahasiswa mampu mempraktikkan cara penanganan dan menimbang hewan uji dengan baik.

Dasar Teori:

Hewan percobaan merupakan hewan yang digunakan dalam penelitian biologis dan biomedis, yang dipilih berdasarkan kriteria atau standar tertentu yang sesuai dengan kebutuhan penelitian. Beberapa mata kuliah pada kurikulum di prodi Farmasi ditunjang dengan praktikum menggunakan hewan uji di laboratorium untuk mencapai keterampilan sebagai capaian pembelajaran mata kuliah tersebut. Hewan uji ini tidak hanya digunakan dalam proses pembelajaran, namun juga menunjang berbagai macam topik penelitian di bidang kefarmasian. Kegiatan penelitian dengan menggunakan hewan uji harus tetap menghormati hak dan martabat subyek penelitian.

Bahan dan Alat Percobaan:

Mencit

Sarung tangan

Tikus

Timbangan

Cara Kerja:

1. Dua belas (12) ekor mencit dibagi dalam 3 subkelompok (@4 ekor). Timbang mencit dan tiga (3) ekor tikus dibagi dalam 3 subkelompok (@1 ekor), timbang tikus.
2. Catat hasil penimbangan mencit dan tikus pada tabel.

Tabel 4. Hasil Percobaan Penanganan Hewan Uji

Meja	gBB	
	Mencit	Tikus
1		
2		
3		

Soal Diskusi:

1. Sebutkan macam-macam hewan uji dan karakteristik masing-masing!
2. Bagaimana cara memilih hewan uji yang baik untuk kegiatan eksperimen?

PERCOBAAN 2

PENGARUH CARA PEMBERIAN OBAT ANALGETIK BERBAGAI RUTE

Tujuan:

1. Mahasiswa mengetahui cara pemberian (secara per oral, intraperitoneal, dan subkutan) terhadap aktivitas obat pada mencit.
2. Mahasiswa mampu mempraktikkan cara pemberian obat berbagai rute (secara per oral, intraperitoneal, dan subkutan).

Dasar Teori:

Untuk mencapai efek farmakologis seperti yang diinginkan, obat dapat diberikan dengan berbagai cara, antara lain melalui oral, subkutan, intra-muskular, intraperitoneal, rektal, dan intravena. Masing-masing cara pemberian ini memiliki keuntungan dan manfaat tertentu. Suatu senyawa atau obat mungkin efektif jika diberikan melalui salah satu cara pemberian, tetapi tidak atau kurang efektif jika diberikan melalui cara lain. Perbedaan ini salah satunya dapat disebabkan oleh adanya perbedaan dalam hal kecepatan absorbs di antara berbagai cara pemberian tersebut. yang selanjutnya akan berpengaruh terhadap efek atau aktivitas farmakologisnya.

Rute dalam pemberian obat dapat mempengaruhi efek suatu obat, karena karakteristik lingkungan fisiologis anatomi dan biokimia yang berbeda pada daerah kontak mula obat dan tubuh. Faktor perbedaan karakteristik tersebut sangat dipengaruhi oleh jumlah suplai darah, struktur anatomi dari lingkungan kontak antara obat-tubuh, enzim-enzim fisiologis yang terdapat di lingkungan tersebut. Secara umum rute pemberian obat dapat dibedakan menjadi 2 yakni rute parenteral dan enteral.

Analgesik diberikan kepada penderita untuk mengurangi rasa nyeri yang disebabkan oleh berbagai rangsang nyeri seperti rangsang mekanis, kimia, dan fisis. Rasa nyeri tersebut disebabkan karena lepasnya mediator-mediator nyeri seperti bradikinin, prostaglandin, atau serotonin dari jaringan yang rusak, yang kemudian akan merangsang reseptor nyeri di ujung saraf perifer atau tempat lain. Dari tempat-tempat ini selanjutnya rangsang nyeri diteruskan ke pusat nyeri di korteks serebri oleh saraf sensoris melalui sumsum tulang belakang dan talamus.

Metode pengujian aktivitas suatu analgesik dilakukan dengan menilai kemampuan zat uji untuk menghilangkan rasa nyeri yang diinduksi pada hewan percobaan, seperti mencit atau tikus. Pada umumnya potensi daya analgesik dinilai pada hewan dengan menggunakan besarnya peningkatan stimulus nyeri atau juga peranan frekuensi respon nyeri (Anonim, 1991).

Turner (1965) membagi metode pengujian daya analgesik menjadi dua berdasarkan jenis analgesiknya sebagai berikut:

1. **Golongan analgesik narkotik**
 - a. metode jepitan ekor
 - b. metode pengukuran tekanan
 - c. metode rangsang panas
 - d. metode potensi petidin
 - e. metode antagonis nalorfin
 - f. metode kejang oksitosin
 - g. metode pencelupan pada air panas

2. Golongan analgesik non-narkotik

- a. metode rangsang kimia
- b. metode pododolorimeter
- c. metode rektodolorimeter

Lokasi Pemberian Senyawa

Rute pemberian pada mencit umumnya adalah injeksi subkutan, intraperitoneal, atau intravena. Pemberian intramuskular dilakukan pada tikus dan tidak direkomendasikan pada mencit karena otot yang terlalu kecil. Pemberian intraplantar, intrasplenic, dan intranodus limfatik harus dibatasi pada kasus khusus. Area penyuntikan dicukup atau dibersihkan dengan air hangat bila perlu sebelum kulit dibersihkan dengan kapas yang dibasahi alcohol atau disinfektan (Hirota dan Shimizu, 2012).

Senyawa yang akan disuntikkan harus disiapkan secara aseptik dan bebas pirogen, khususnya untuk injeksi parenteral. Sterilisasi dapat dilakukan secara filtrasi. Perlu dipertimbangkan toksisitas senyawa, volume, dan rute pemberian untuk mencegah kerusakan jaringan dan pemberian tepat dosis. Pelarut atau pembawa yang umum mencegah kerusakan jaringan dan pemberian tepat dosis. Pelarut atau pembawa yang umum digunakan karena tidak memengaruhi kerja obat karena sifatnya sendiri adalah air, air dengan NaCl 0,85%, air dengan polietilen glikol hingga 50%, air dengan tween 80 maksimal 10%, air dengan metilselulosa atau karboksimetilselulosa 0,25%, dan minyak jagung/sayur/kacang (untuk per oral dan per intramuskular) (Hirota dan Shimizu, 2012).

Senyawa sebaiknya dipersiapkan sedekat mungkin dengan waktu penggunaannya karena dapat rusak dalam pelarutnya bila dibiarkan dalam beberapa jam. Temperature cairan harus setidaknya sama dengan suhu ruangan karena injeksi larutan yang dingin akan menyakitkan. Konsentrasi larutan dapat bermacam-macam, namun konsentrasi rendah lebih diinginkan. Larutan konsentrasi tinggi dapat diberikan per intravena dengan laju injeksi yang diperlambat. Larutan sebaiknya dalam rentang pH 4,5 – 8,0. Volume pemberian dibuat sekecil mungkin agar tidak mengejutkan mencit. Frekuensi pemberian dibuat seminimum mungkin untuk menghindari stress yang tidak perlu. Laju absorpsi obat dipengaruhi aliran darah dan luas permukaan pada tempat pemberian senyawa, kelarutan senyawa pada jaringan, kelarutan lemak, sifat fisikokimia, derajat ionisasi dan ukuran molekul senyawa. Urutan laju absorpsi secara umum $iv > ip > im > sc > po$ (Hirota dan Shimizu, 2012).

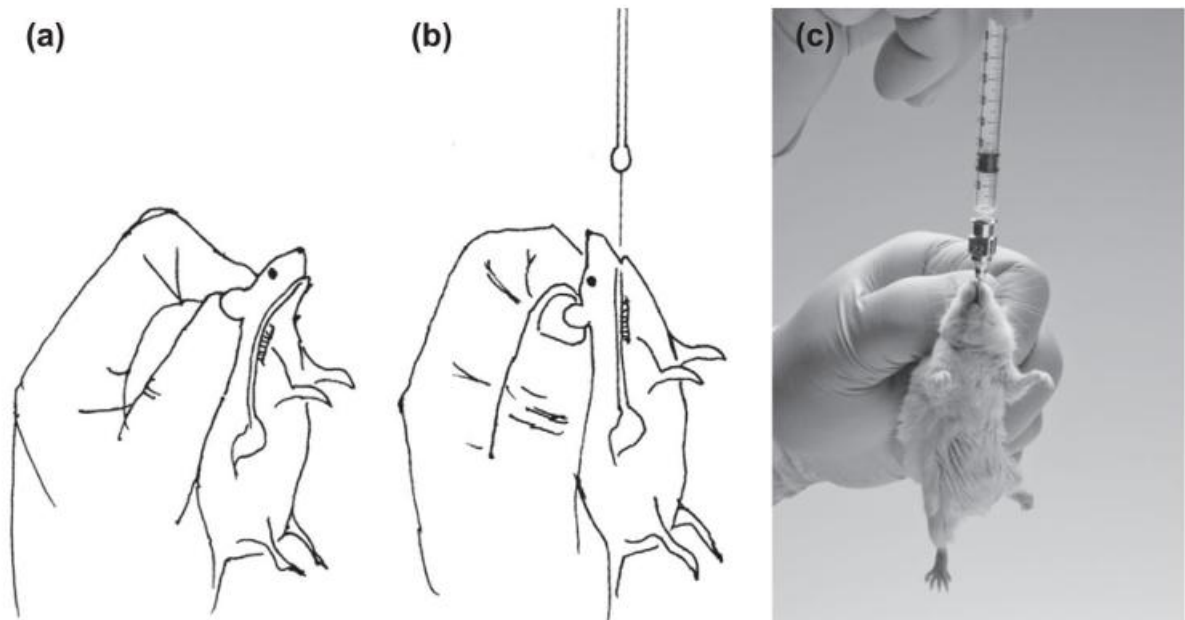
Ukuran jarum umumnya 26 – 27G, 12,5 – 15,6 mm (1/2 s.d. 5/8 inch). Diusahakan sekecil mungkin untuk menghindari kebocoran cairan dan meminimalkan ketidaknyamanan pada hewan coba. Volume spuit umumnya 1 – 2 ml dan bila pemberian < 0,1 ml dapat digunakan spuit dan jarum insulin. Sebelum disuntikkan, gelembung udara pada cairan, spuit, dan jarum harus dibersihkan dengan mengetuk sisi jarum suntik dan mengeluarkan udara secara perlahan hingga cairan pada ujung jarum dapat mengeluarkan udara (Hirota dan Shimizu, 2012).

Cara pemberian obat pada hewan uji

1. Pemberian Senyawa Secara Enteral

Pemberian per enteral memberikan keuntungan yaitu volume pemberian yang dapat lebih besar dan dapat mentoleransi pemberian larutan pH asam (hingga pH 3).

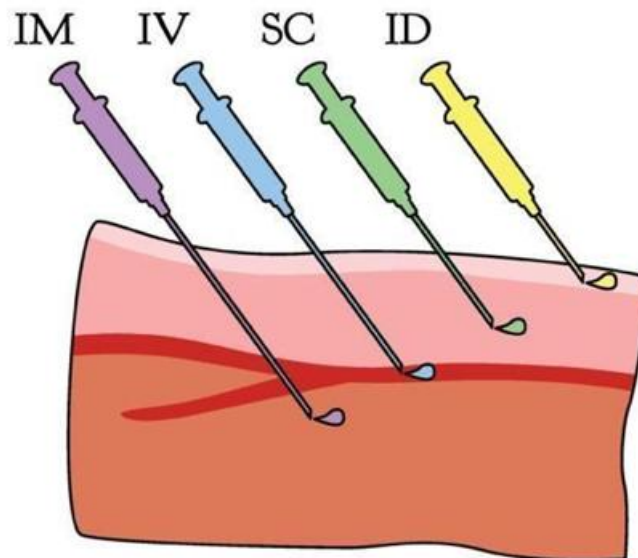
Namun demikian pemberian per enteral kurang mentoleransi larutan basa dan senyawa yang mudah dihancurkan oleh cairan lambung, serta adanya makanan mempengaruhi pengosongan lambung. Senyawa dapat diberikan dengan dicampur makanan atau air (per oral) atau langsung disondekan (intragastrik). Pemberian per sonde lebih disukai untuk menghindari ketidakpresisian jumlah senyawa yang tertelan akibat adanya sisa makanan/minuman hewan coba. Jarum berujung bola digunakan untuk mencegah kerusakan esofagus atau penyuntikan melewati glottal yang terbuka hingga menuju trakea. Ukuran jarum sonde untuk mencit dewasa adalah 22G (Hirota and Shimizu, 2012).



Gambar 6. Prosedur pemberian intragastric menggunakan jarum sonde. (a) sebelum menarik leher mencit; (b) terbentuk garis lurus antara mulut dan lambung; (c) injeksi intragastric diberikan menggunakan spuit 1,0 ml dengan jarum sonde 22G x 1,0 (Hirota dan Shimizu, 2012)

2. Pemberian Senyawa Secara Parenteral

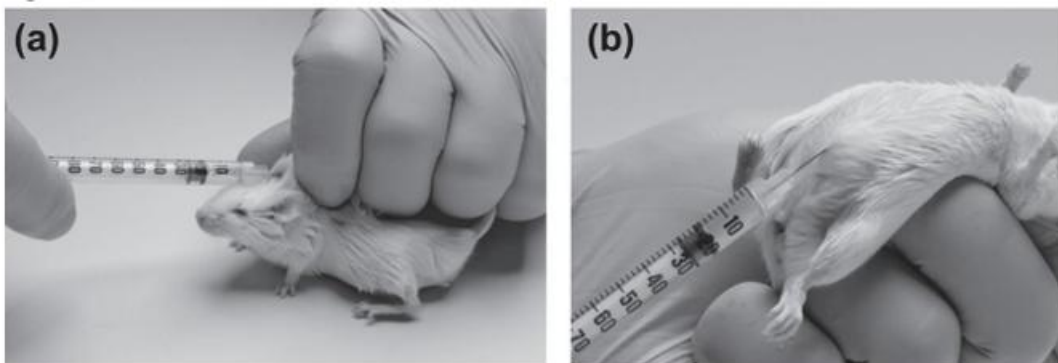
Pemberian senyawa uji adalah selain melalui saluran pencernaan adalah melalui injeksi, infusi, aplikasi topikal, inhalasi, dan implan pompa osmotik atau pellet dengan pelepasan terkendali. Bila volume larutan kecil maka senyawa diinjeksikan, sedangkan bila volume besar maka diinfusikan (Hirota and Shimizu, 2012).



Gambar 7. Perbedaan pemberian senyawa dengan berbagai macam rute (Turner *et al.*, 2011)

a. Injeksi Subkutan

Pemberian subkutan dapat dilakukan mencit dalam keadaan sadar karena jarang menyakitkan dan relatif mudah. Laju absorpsi lebih lambat dibandingkan intraperitoneal atau intramuskular. Injeksi subkutan dilakukan pada kulit yang longgar pada area interskapular atau inguinal (Hirota and Shimizu, 2012).



Gambar 8. Injeksi subkutan. (a) Injeksi subkutan pada dasar lipatan kulit yang longgar (area leher); (b) injeksi subkutan pada kuadran kiri bawah (Hirota and Shimizu, 2012)

b. Injeksi Intraperitoneal

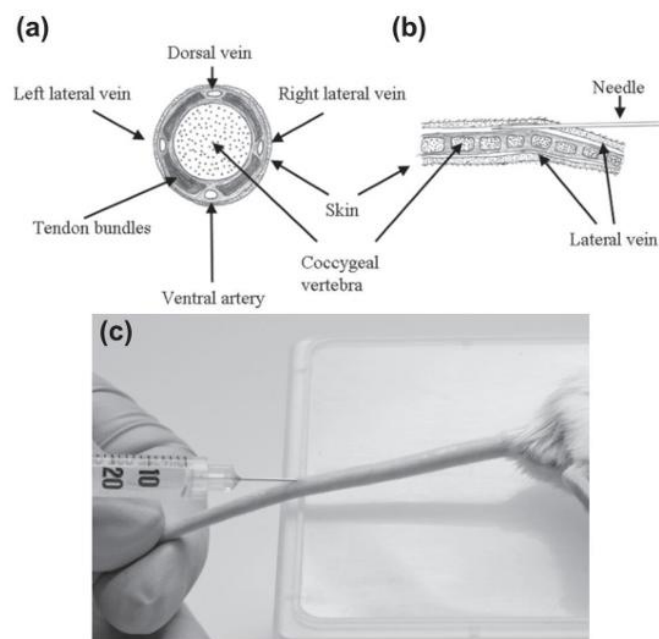
Intraperitoneal merupakan rute yang paling umum digunakan, paling sederhana dan mudah. Rute ini memungkinkan absorpsi dari tempat penyimpanan dalam waktu yang cukup lama. Keterbatasan metode ini adalah sensitivitas jaringan terhadap senyawa dan kurang toleran terhadap pH non-fisiologis. Larutan yang diberikan harus isotonik. Pada saat penyuntikan larutan, jarum dan spuit harus dijaga hampir paralel (membentuk sudut 10°) dengan kolumna vertebra mencit untuk menghindari ketidaksengajaan menyuntik hingga mengenai organ dalam tubuh (Hirota and Shimizu, 2012).



Gambar 9. Injeksi intraperitoneal pada kuadran kiri bawah (Hirota and Shimizu, 2012)

c. Injeksi Intravena

Injeksi intravena pada umumnya diberikan melalui vena pada ekor tikus. Alternatif lain adalah melalui pleksus oftalmik, vena jugular eksternal, vena metatarsal, dan vena sublingual. Rute ini menjadi pilihan untuk larutan yang tinggi konsentrasinya, pH tinggi atau rendah, dan mengiritasi, dengan catatan pemberiannya harus perlahan dan penuh kehati-hatian agar tidak keluar dari vena. Mencit diletakkan di dalam restrainer atau dianestesi dan ekornya dihangatkan dengan handuk hangat atau dicelupkan di air hangat (40-45°C) untuk mendilatasi pembuluh darah. Selanjutnya ekor didilatasi dengan alkohol 70%. Jarum dimasukkan 2-4 mm ke dalam lumen ekor dengan posisi spuit paralel dengan ekor. Larutan disuntikkan perlahan dan bila pemberian sudah tepat maka tidak terasa adanya tahanan. Setelah selesai kanula dicabut sambil lokasi penyuntikan ditekan kuat dengan swab atau jari untuk menghindari terjadinya aliran balik cairan dan/atau darah (Hirota and Shimizu, 2012).



Gambar 10. Injeksi intravena (a) penampang transversal dari ekor tikus; (b) penampang sagital ekor tikus (c) injeksi intravena pada ekor lateral mencit yang dianestesi (Hirota and Shimizu, 2012)

d. Injeksi Intramuskular

Injeksi intramuskular dilakukan pada bagian paha mencit (sebaiknya tikus karena otot mencit berukuran kecil). Ujung jarum harus jauh dari femur dan saraf sciatic. Mencit dianestesi atau dikekang secara manual oleh orang lain. Ujung jarum dimasukkan melalui kulit menuju otot dan sebelum injeksi dilakukan spuit ditarik sedikit untuk melihat adanya aliran balik darah atau cairan tubuh. Bila hal itu terjadi, prosedur harus dihentikan dan jarum harus dipindahkan ke tempat yang baru (Hirota and Shimizu, 2012).



Gambar 11. Injeksi intramuskular ke otot kaki (Hirota and Shimizu, 2012)

e. Injeksi Intradermal

Rute ini sangat sulit dilakukan pada mencit karena kulitnya sangat tipis. Oleh karenanya sebaiknya dilakukan pada tikus. Mencit dianestesi, bulu pada bagian punggung, abdomen ventral, atau telapak kaki belakang dicukur lalu area didesinfeksi dengan etanol 70%. Kulit dipegang dengan ibu jari dan jari telunjuk dan jarum dimasukkan menyerong ke atas dengan sudut kecil, yaitu pada posisi di bawah lapisan permukaan epidermis. Bila berhasil maka akan terlihat lokais injeksi sedikit melepuh.

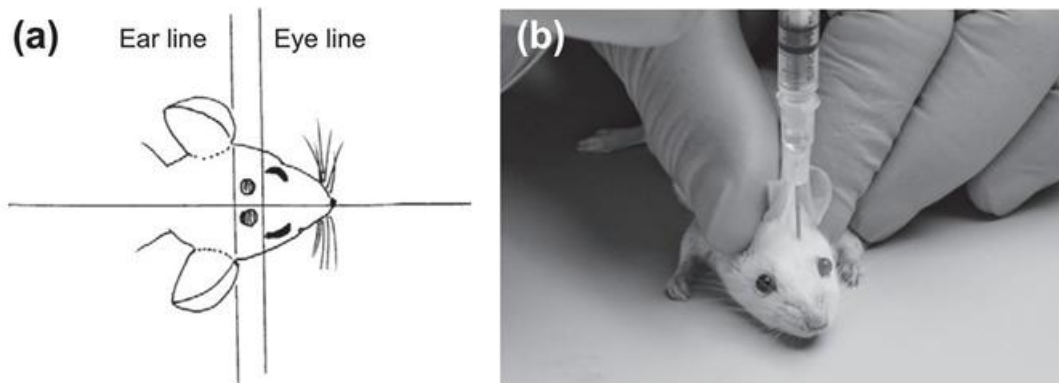


Gambar 12. Injeksi intradermal pada kulit bagian punggung (Hirota and Shimizu, 2012)

f. Injeksi intraserebral

Mencit dianestesi dan dikekang secara manual pada permukaan datar. Lokasi injeksi adalah daerah antara mata dan telinga, yaitu di dekat midline. Jarum intradermal digunakan untuk mencegah penetrasi yang terlalu dalam ke serebral. Bila diperlukan

injeksi ke bagian otak yang spesifik, perlu dilakukan pengekanan menggunakan instrumen *stereotaxic* Binatang.



Gambar 13. Injeksi intraserebral (Hirota and Shimizu, 2012)

g. Injeksi Intrathoracic

Injeksi intrathoracic terbatas peruntukannya untuk eksperimen tertentu. Injeksi dilakukan menggunakan jarum tertentu yang sedikit melengkung ke daerah antara tulang iga, kurang lebih di bagian tengah rongga dada. Injeksi dilakukan hati-hati agar tidak mengenai jaringan paru (Hirota and Shimizu, 2012).

h. Injeksi Intranasal

Injeksi intranasal umumnya dilakukan pada mencit yang dianestesi. Mencit dikekang secara manual dan diposisikan terlentang dengan kepala mendongak ke atas. Injeksi dilakukan menggunakan mikropipet secara perlahan (Hirota and Shimizu, 2012).



Gambar 14. Injeksi intranasal (Hirota and Shimizu, 2012)

i. Aplikasi Topikal

Tempat aplikasi sediaan umumnya pada kulit di bagian punggung atau abdomen. Setelah bulu mencit dicukur, selanjutnya area dibersihkan dari lemak dan debris lainnya. Senyawa yang akan diberikan dilarutkan dalam pelarut volatil atau dicampur dalam krim yang sesuai untuk diaplikasikan dengan swab. Hewan perlu dijaga agar tidak menjilat atau menggaruk daerah yang diberi sediaan (Hirota and Shimizu, 2012).

j. Inhalasi

Rute ini digunakan untuk eksperimen asma, polusi udara, atau respirasi. Permasalahan utama dari penggunaan rute ini adalah pembuatan senyawa dalam

aerosol bila senyawa uji tidak cukup volatil dan penentuan dosis senyawa. Ukuran diameter partikel yang optimum antara 0,5 - 2,00 μm (Hirota and Shimizu, 2012).

Bahan dan Alat Percobaan

Mencit	sprit injeksi 1 ml (4)
Timbangan hewan	sprit oral (4)
Ketorolac 0,2 mg/ml dosis 5 mg/kgBB	Stopwatch (4)
Aquadest	Hotplate

Cara kerja:

1. Dua belas (12) ekor mencit dibagi menjadi **3 kelompok praktikan** (@4 ekor). Timbang mencit dan hitung volume pemberian obat.
2. Pada setiap kelompok praktikan, lakukan 4 perlakuan (masing-masing 1 ekor):
 - i) Kontrol: aquadest (p.o.)
 - ii) Ketorolac p.o.
 - iii) Ketorolac s.c.
 - iv) Ketorolac i.p.
3. Setelah 15 menit, hewan diletakkan di pelat panas suhu 50°C pada menit ke 30, 60, 90. Catat jumlah waktu (menit/detik) yang dibutuhkan mencit untuk menjilat atau meloncat dari plat panas.
4. Hentikan waktu saat muncul indikator nyeri pertama: menjilat kaki belakang atau meloncat. Angkat mencit segera dan catat latensi (detik) pada baris 0 (pre-obat). Terapkan cut-off 30 detik: bila tidak ada respon sampai 30 detik, angkat dan catat 30 detik.
5. Buat grafik waktu pengukuran (sumbu X) vs rerata latensi (waktu menjilat/meloncat mencit) (sumbu Y).
6. Buat grafik efek bersih: Waktu vs Δ Latensi. Δ latensi = latensi(t) – latensi(pre-obat) untuk tiap mencit

Tabel 5. Rerata waktu hasil percobaan efek analgetik dengan rangsang panas

Waktu (menit)	Kontrol				Peroral				Subkutan				Intraperitoneal			
	1	2	3	$\bar{x}$	1	2	3	$\bar{x}$	1	2	3	$\bar{x}$	1	2	3	$\bar{x}$
0 (pre-obat)																
15																
30																
60																
90																

Soal Diskusi:

1. Jelaskan perbedaan dan contoh pemberian obat secara enteral dan parenteral!
2. Bagaimanakah onset obat pada proses pemberian secara per oral, subkutan, intravena, intramuskular, dan intraperitoneal? Berikan alasannya!
3. Sebutkan keuntungan dan kerugian pemberian obat secara enteral dan parenteral!

PERCOBAAN 3

INDUKSI INFLAMASI AKUT PADA MENCIT (*CARRAGEENAN PAW EDEMA MODEL*)

Tujuan:

1. Membuat model inflamasi akut dengan *carrageenan-induced paw edema* pada *subplantar region* secara intraplantar.
2. Menentukan profil perkembangan edema

Dasar Teori:

Inflamasi atau peradangan merupakan suatu respon fisiologis terhadap berbagai rangsangan seperti infeksi atau cedera jaringan. Secara klinis, inflamasi akut ditandai oleh lima tanda klasik: rubor (kemerahan), calor (panas), tumor (bengkak), dolor (nyeri), dan function (penurunan fungsi). Inflamasi yang terjadi bisa lokal, sistemik, akut dan kronis yang dapat menimbulkan kelainan patologis. Pada tingkat mikrosirkulasi, inflamasi akut melibatkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas kapiler sehingga terjadi ekstrasvasi cairan dan protein plasma ke jaringan interstisial yang memunculkan edema. Inflamasi sering tidak diinginkan karena disertai dengan berbagai gejala. Keadaan inilah yang mendorong penderita untuk mengatasi dan mengobati inflamasi yang terjadi.

Secara umum model inflamasi dibedakan menjadi 2 berdasarkan jenis inflamasi, yaitu model inflamasi akut dan model inflamasi kronik. Inflamasi akut dapat dibuat dengan berbagai cara seperti induksi udem kaki tikus, pembentukan eritema (respon kemerahan) dan pembentukan eksudasi inflamasi. Inflamasi kronis dapat dibuat dengan pembentukan granuloma dan induksi artritis.

Bahan dan Alat Percobaan:

- Mencit
- Timbangan hewan
- Pletismometer
- Syringe Insulin 0,5 cc x 30 G 100 U
- Spuit oral untuk mencit
- Alat-alat gelas
- Larutan karagenan 1% dalam air suling (dibuat semalam sebelum eksperimen digerus dengan PGA), volume penyuntikan 30 μ L intraplantar.

Cara Kerja:

1. Enam (6) ekor mencit dibagi menjadi 3 subkelompok praktikan @2 ekor. Setiap mencit diberi kode dan ditimbang untuk pencatatan BB.
2. Pada t_0 (sebelum induksi), ukur volume *paw baseline* dengan pletismometer pada *paw* yang sama untuk semua mencit (mis. *hind paw* kanan). Pengukuran dilakukan 2 kali (V_{0-1} dan V_{0-2}) dan diambil rata-rata sebagai V_0 (mL).
3. Lakukan induksi inflamasi 1 kali dengan menyuntikkan karagenan 1% sebanyak 30 μ L pada telapak kaki belakang secara intraplantar/*footpad*. Injeksi dilakukan perlahan hingga terbentuk *bleb* kecil dan tidak bocor.

4. Segera setelah induksi ($\pm 1-5$ menit), ukur kembali volume *paw* dengan pletismometer sebanyak 2 kali (V_{1-1} dan V_{1-2}) dan diambil rata-rata sebagai V_1 (mL). Hitung $\Delta V = V_1 - V_0$ dan catat apakah terjadi bocor (ya/tidak).
5. Setelah itu, mencit dikembalikan ke kandang dan dilanjutkan ke Percobaan 4 untuk pemberian perlakuan (kalium diklofenak dan deksametason) serta pengukuran edema pada waktu yang ditetapkan di Percobaan 4.

Tabel 6. Data *baseline paw* dan induksi karagenan (per mencit)

Meja	Perlakuan	BB (g)	V_{0-1}	V_{0-2}	V_0	V_{1-1}	V_{1-2}	V_1	$\Delta V = V_1 - V_0$	Bocor (Ya/Tidak)
1	Kontrol									
	Na-diclofenak									
2	Kontrol									
	Na-diclofenak									
3	Kontrol									
	Na-diclofenak									

Soal Diskusi:

1. Mengapa induksi dilakukan intraplantar/footpad (daerah plantar–subplantar) dan bukan disuntik di tempat lain (misal dorsal paw atau i.p.) jika tujuan kita mengukur edema lokal?
2. Jika $\Delta V = V_1 - V_0$ sangat kecil atau bahkan negatif, apa saja kemungkinan penyebabnya?
3. Pletismometer mengukur volume berdasarkan perpindahan cairan. Faktor apa yang bisa membuat hasil bias?

PERCOBAAN 4

UJI AKTIVITAS OBAT ANTIINFLAMASI MENGGUNAKAN *CARRAGEENAN PAW EDEMA MODEL*

Tujuan:

1. Mengevaluasi aktivitas antiinflamasi natrium diklofenak pada mencit menggunakan model *carrageenan paw edema*.
2. Membandingkan derajat paw edema antara kelompok kontrol dan kelompok natrium diklofenak setelah induksi karagenan.

Dasar Teori:

Antiinflamasi didefinisikan sebagai obat atau golongan obat yang memiliki aktivitas menekan atau mengurangi peradangan. Aktivitas ini dapat dicapai melalui proses penghambatan terbentuknya mediator radang (prostaglandin) dari tempat-tempat pembentukannya. Berdasarkan mekanisme kerjanya, obat antiinflamasi terbagi dalam 2 golongan yaitu:

1. golongan steroid: bekerja dengan cara menghambat pelepasan prostaglandin dari sel-sel sumbernya, contoh: kortikosteroid; dan
2. golongan non-steroid: bekerja melalui mekanisme lain seperti inhibisi siklooksigenase yang berperan pada biosintesa prostaglandin, contoh: aspirin, indometasin, fenilbutason, dll.

Sampai sekarang fenomena pada tingkat bioseluler masih belum dapat dijelaskan secara rinci, walaupun demikian banyak hal yang telah diketahui dan disepakati. Fenomena inflamasi meliputi kerusakan mikrovaskular, meningkatnya permeabilitas kapiler, dan migrasi leukosit ke jaringan radang. Gejala proses radang yang sudah dikenal adalah kalor, rubor, tumor, dan *function laesa*. Selama berlangsungnya fenomena radang banyak mediator kimiawi yang dilepaskan secara lokal antara lain: histamin, 5-HT, faktor kemotaktik, bradykinin, leukotriene, dan prostaglandin.

Obat-obat analgesik antipiretik serta obat antiinflamasi non steroid (AINS) merupakan suatu kelompok obat yang heterogen, bahkan beberapa obat sangat berbeda secara kimia. Walaupun demikian obat-obat ini ternyata memiliki banyak persamaan dalam efek terapi maupun efek samping. Hal ini didasarkan atas penghambatan prostaglandin. Golongan obat ini menghambat enzim siklooksigenase hingga konversi asam arakidonat menjadi PGG₂ terganggu. Setiap obat menghambat siklooksigenase dengan cara berbeda.

Obat-obat AINS ditinjau dari segi efektivitasnya dapat dibagi dalam 3 kelompok, yaitu:

1. efek antiinflamasi lemah: parasetamol.
2. Efek antiinflamasi ringan:
 - a. derivat asam propionate: fenbufen, ketoprofen, ibuprofen, naproksen;
 - b. derivat asam fenamat: asam mefenamat; dan
 - c. obat non asam: nabumeton.
3. Efek antiinflamasi kuat:
 - a. derivat asam salisilat: aspirin, diflusinal, benorilate, salsalat;
 - b. derivat pirasolon: oksifenbutason, antipirin, aminopirin;

- c. derivat indol asam asetat: diklofenak, indometasin, sulindak, tolmetin; dan
- d. derivat oksikam: piroksikam.

Bahan dan Alat Percobaan:

- Mencit
- Timbangan hewan
- Pletysmometer
- Spuit oral untuk mencit
- Alat-alat gelas
- Larutan karagenan 1% dalam air suling (dibuat semalam sebelum eksperimen digerus dengan PGA), volume penyuntikan 30 μL intraplantar.
- Na-diklofenak 5 mg/kgBB dengan konsentrasi 0,005% (b/v)

Cara Kerja:

1. Lanjutan dari Percobaan 3: gunakan 6 mencit yang sudah diukur V_0 (baseline) dan V_1 ($\pm 1-5$ menit post-induksi) setelah injeksi karagenan 1% 30 μL intraplantar/footpad.
2. Pembagian perlakuan: tetapkan 3 perlakuan dengan total $n=2$ per perlakuan (masing-masing 1 ekor dari tiap subkelompok praktikan):
 - a. Aquadest: kontrol p.o.
 - b. Na-diklofenak: p.o.
 Catat kode mencit yang masuk ke masing-masing perlakuan.
3. Waktu onset: tunggu 20 menit setelah pemberian obat p.o. (tanpa pengukuran).
4. Lakukan pengukuran volume kaki yang diberi perlakuan setiap $t = 0, 10, 15, 30, 45$ dan 60 menit. Catat sebagai V_t (mL) untuk tiap mencit.
5. Perhitungan volume edema dilakukan dengan mengukur selisih volume mencit setelah dan sebelum perlakuan.

Rumus volume edema:

$$V_{u(t)} = V_t - V_0$$

Keterangan:

$V_{u(t)}$: volume edema kaki mencit pada waktu tertentu

V_t : volume kaki mencit setelah diberikan perlakuan pada waktu t

V_0 : *baseline* sebelum induksi (data dari Percobaan 3)

6. Metode penentuan persen penghambatan inflamasi dengan menghitung luas area di bawah kurva (AUC) untuk setiap mencit pada setiap rentang waktu pengukuran 0-60 menit dengan metode trapezoid dengan rumus:

$$AUC_{V_{n-1}}^{V_n} = \frac{V_{tn-1} + V_{tn}}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

Keterangan:

V_{tn-1} : rerata volume edema pada t_{n-1}

V_{tn} : rerata volume edema pada t_n

t_{n-1} : waktu pengukuran sebelum menit n

t_n : waktu pengukuran menit n

Selanjutnya, dapat dihitung % penghambatan imflamasinya dengan rumus:

$$\text{Penghambatan inflamasi (\%)} = \frac{(AUC_{0-x})_0 - (AUC_{0-x})_n}{(AUC_{0-x})_0} \times 100\%$$

Keterangan:

$(AUC_{0-x})_0$: AUC_{0-x} rerata kelompok kontrol negatif

$(AUC_{0-x})_n$: AUC_{0-x} masing-masing hewan uji yang diberi senyawa uji dengan dosis

Tabel 7. Rerata volume udem mencit akibat induksi karagenin

Waktu (menit)	Kontrol				Na-diklofenak			
	1	2	3	$\bar{x}$	1	2	3	$\bar{x}$
0								
10								
15								
30								
45								
60								

Soal Diskusi:

- Menurutmu, apa keuntungan dan kelemahan desain “menunggu onset dulu baru mulai seri pengukuran”, dibanding desain “ukur sejak segera setelah pemberian obat”?
- Prediksi kurva: dibanding kontrol, kelompok diklofenak seharusnya menunjukkan:
 - $V_u(t)$ lebih kecil pada semua titik waktu, atau
 - perbedaan makin jelas pada titik waktu tertentu?
 Jelaskan dengan mengaitkan mekanisme kerja NSAID.

PERCOBAAN 5

EFEK PENURUNAN GULA DARAH

Tujuan:

Memahami efek penurunan gula darah menggunakan Uji Toleransi Gula Oral (UTGO).

Dasar Teori:

Hiperglikemia adalah suatu kondisi medik berupa peningkatan kadar glukosa dalam darah yang melebihi batas normal. Hiperglikemia merupakan salah satu tanda khas penyakit diabetes melitus (DM), meskipun juga mungkin didapatkan pada beberapa keadaan yang lain. Diabetes melitus ditandai dengan ketiadaan absolut insulin atau insensitivitas sel terhadap insulin. Insulin ialah hormon polipeptida yang dihasilkan oleh sel beta dalam islet Langerhans pankreas dan berperan penting pada metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Hormon ini menurunkan kadar glukosa darah, asam lemak, dan asam amino dalam darah yang mendorong penyimpanan nutrient-nutrien tersebut dalam bentuk glikogen. Bila kadar glukosa darah rendah maka sel pankreas menghasilkan glucagon yang berfungsi memecahkan glikogen menjadi glukosa. Klasifikasi DM dapat dibedakan menjadi beberapa tipe yakni tipe 1, tipe 2, tipe lain, dan tipe diabetes gestasional.

Gula merupakan salah satu sumber energi utama bagi tubuh yang diperoleh dari makanan, terutama karbohidrat. Apabila kadar gula dalam darah meningkat seperti setelah makan, maka sel-sel beta pankreas akan mengeluarkan hormon insulin. Selanjutnya gula darah dapat terserap ke dalam sel-sel tubuh yang nantinya dapat digunakan sebagai bahan bakar atau untuk menghasilkan zat lain yang diperlukan tubuh atau sekedar disimpan. Namun bila kadar gula darah mengalami penurunan, maka produksi insulin pun berkurang. Keadaan dimana sel-sel tubuh tidak responsif terhadap insulin, atau terdapat resistensi insulin, akan menyebabkan ketidakmampuan menyerap gula yang tersedia sehingga tidak dapat digunakan oleh sel tubuh.

Tindakan diagnosis dilakukan untuk menentukan apakah seseorang menderita penyakit diabetes melitus. Uji diagnosis diabetes melitus umumnya dilakukan berdasarkan keluhan penderita yang khas berupa polyuria, polydipsia, polifagia, dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan penyebabnya. Keluhan lain yang mungkin dikemukakan pasien adalah mudah lemas, kesemutan, gatal, mata kabur, disfungsi ereksi pada pria, pruritus, vulvae pada pasien Wanita dan adanya peningkatan kadar glukosa darah yang ditentukan berdasarkan pemeriksaan laboratorium.

Glukosa dapat diukur dengan menggunakan sampel darah total, plasma, serum, cairan serebrospinal, cairan pleural, dan urin sesuai dengan tujuan diagnosisnya. Glukosa darah kapilari merupakan sumber dari kebanyakan alat pengukuran glukosa yang menggunakan spesimen darah total. Kadar glukosa darah kapilari ini setara dengan kadar glukosa arterial tapi dapat berbeda dari kadar glukosa vena, bergantung pada waktu pemeriksaan relatif terhadap pencernaan makanan. Pemeriksaan laboratorium yang dapat membantu menegakkan diagnosis diabetes mellitus antara lain pengukuran kadar glukosa darah (kadar glukosa darah sewaktu, kadar glukosa darah puasa, kadar glukosa postprandial, serta tes toleransi glukosa oral), analisis urin, pemeriksaan kadar HbA1c (hemoglobin terglikosilasi), pemeriksaan keton dan pengukuran kadar hormon inkretin.

Pada praktek sehari-hari, kadar glukosa darah dapat diukur secara konvensional menggunakan alat ukur kadar glukosa darah yang sudah banyak dijual dipasaran dengan menggunakan sampel darah kapilari. Percobaan uji diabetes di laboratorium dapat dilakukan pada hewan percobaan (mencit) dan disebut sebagai percobaan uji diabetes secara konvensional (wet lab). Beberapa teknik yang sering digunakan untuk menyebabkan hewan uji menderita diabetes adalah induksi dengan bahan kimia. Induksi kimia pada hewan akan menyebabkan hewan coba menderita diabetes tipe I dimana banyaknya sel beta yang hancur dengan demikian, jumlah insulin endogen yang diproduksi menjadi sedikit, yang mengarah ke hiperglikemia dan penurunan berat badan. Diabetes dengan diinduksi secara kimia tidak hanya menyediakan model sederhana dan relatif murah tetapi juga dapat digunakan pada hewan yang lebih tinggi.

1. Streptozotocin (STZ)

STZ [2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose] disintesis oleh *Streptomyces achromogenes*. Setelah pemberian i.p. atau i.v. obat akan memasuki sel beta pankreas melalui Glut-2 transporter dan menyebabkan alkilasi dari DNA. Aktivasi berikutnya PARP menyebabkan deplesi NAD^+ , pengurangan ATP seluler dan hasilnya penghambatan produksi insulin. Selain itu, STZ merupakan sumber radikal bebas yang juga dapat berkontribusi terhadap kerusakan DNA dan akhirnya kematian pada sel. STZ dapat digunakan dengan sekali pemberian dengan dosis tinggi (100-200 mg/kg BB tikus dan 35-65 mg/kg BB mencit); atau diberikan berulang dengan dosis rendah selama 5 hari (20-40 mg/kg per hari).

2. Aloksan

Efek diabetes aloksan (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil) terutama disebabkan ambilan cepat oleh sel beta dan pembentukan radikal bebas, dimana sel beta memiliki mekanisme pertahanan yang buruk untuk radikal bebas tersebut. Aloksan direduksi menjadi asam dialuric dan kemudian teroksidasi kembali menjadi aloksan, menciptakan siklus redoks untuk regenerasi radikal superoksida yang mengalami dismutasi untuk membentuk hidrogen peroksida dan selanjutnya membentuk radikal hidroksil yang sangat reaktif dan menyebabkan fragmentasi DNA sel beta. Aloksan juga diambil oleh hati, tetapi hati memiliki perlindungan yang lebih baik untuk oksigen reaktif dan oleh karena itu hati tidak rentan terhadap kerusakan. Mekanisme lain kerusakan sel beta oleh aloksan termasuk oksidasi gugus SH yang esensial, terutama dari glukokinase dan gangguan dalam homeostasis kalsium intraseluler. Dosis pada tikus berkisar dari 50-200 mg/kg dan pada mencit dari 40-200 mg/kg BB, tergantung pada strain dan rute pemberian dimana pemberian ip dan s.c membutuhkan hingga tiga kali lebih besar dari dosis dengan rute i.v. Dosis 100 mg/kg BB telah digunakan untuk membuat diabetes jangka panjang pada kelinci. Perlu dicatat bahwa aloksan memiliki indeks dosis diabetogenik yang sempit, sehingga overdosis ringan bisa menyebabkan toksisitas umum, terutama untuk ginjal.

3. Glukosa

Pada cara ini mencit yang digunakan adalah mencit normal yang dibebani sukrosa tanpa merusak pankreasnya, karena berdasarkan teori bahwa dengan pembebanan sukrosa akan menyebabkan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemik) secara

cepat. Sukrosa di dalam tubuh dapat terurai menjadi glukosa dan fruktosa. Kadar glukosa yang tinggi dalam darah dapat diturunkan oleh zat-zat berefek antihiperglikemik

Metode pengukuran kadar glukosa darah antara lain:

1. Dengan spektrofotometer

Darah mencit diambil melalui ekor sebanyak 0,5-1 ml ke dalam tabung ependorf. Darah disentrifusa selama 10 menit untuk diambil serumnya sebanyak 50 µl dan kemudian ditambahkan urasil asetat 500 µl dan disentrifusa kembali. Supernatan sebanyak 50 µl diambil dan ditambahkan pereaksi enzim kit glukosa 500 µl, kemudian diinkubasi selama 10 menit dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm untuk mendapatkan nilai kadar glukosa darah. Hal yang sama dilakukan untuk blanko dan standar glukosa

2. Dengan Glukometer

Terdiri dari alat glukometer dan strip glukosa glukometer yang sesuai dengan nomor pada alat. Alat ini secara otomatis akan hidup ketika strip glukosa dimasukkan dan akan mati setelah strip glukosa dicabut. Masukkan strip ke dalam alat glukometer, sehingga glukometer ini akan hidup secara otomatis, kemudian dicocokkan kode nomor yang muncul pada layar dengan yang ada pada vial check glucose Tes strip. Tes strip yang dimasukkan pada glukometer pada bagian layar yang tertera angka yang harus sesuai dengan kode vial check glucose test strip, kemudian pada layar monitor glukometer muncul tanda siap untuk diteteskkan darah. Sentuhkan tetesan darah yang keluar langsung dari pembuluh darah ke test strip dan ditarik sendirinya melalui aksi kapiler. Ketika wadah terisi penuh oleh darah, alat mulai mengukur kadar glukosa darah. Hasil pengukuran diperoleh selama 10 detik.

Untuk model induksi hiperglikemia, disarankan pengujian yang dapat meningkatkan kadar gula darah (200-350 mg/dL) pada hewan uji. Induksi hiperglikemia dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain: dengan uji toleransi gula oral (UTGO). Pada UTGO, hewan uji dipuaskan 8-10 jam kemudian diukur kadar glukosa darahnya. Setelah itu diberi larutan gula (misalnya glukosa 2 g/kgBB) per oral dan dilakukan pengukuran kadar gula darah pada menit ke-30, 60, 90 dan 120 setelah pemberian larutan gula. Kadar glukosa darah puasa dan post loading glukosa dibandingkan terhadap kontrol normal. Hewan uji dikatakan mengalami toleransi glukosa jika nilai AUC (Area Under Curve) kadar glukosa selama 120 menit pengukuran lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol normal. Toleransi glukosa sebagai uji pendahuluan efektifitas sediaan uji dalam menurunkan kadar gula darah untuk dapat diteliti lebih lanjut.

Penentuan toleransi glukosa dengan menghitung luas area di bawah kurva (AUC) untuk setiap mencit pada setiap rentang waktu pengukuran 90 menit dengan metode trapezoid dengan rumus:

$$AUC = \frac{C_{tn-1} + C_{tn}}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

Keterangan:

AUC : luas daerah rata-rata di bawah kurva yang merupakan hubungan kadar glukosa darah rata-rata

tiap waktu

$C_{t_{n-1}}$: rata-rata kadar glukosa darah pada t_{n-1}

C_{t_n} : rata-rata kadar glukosa darah pada t_n

t_{n-1} : waktu pengukuran sebelumnya menit n

t_n : waktu pengukuran menit n

Bahan dan Alat Percobaan:

Mencit

Sprit oral kecil (untuk mencit)

Timbangan hewan

Glukometer dan strip

Larutan glukosa 5% 1g/kgBB mencit secara p.o.

Stopwatch

Aquadest dosis 25 g/kgBB, pemberian 0,5 ml/ 20 gBB

Cara Kerja:

1. Enam (6) ekor mencit dibagi dalam 3 subkelompok @2 ekor mencit. Kelompok I sebagai kontrol negatif, kelompok II sebagai kelompok induksi glukosa.
2. Sebelum pemberian glukosa maupun aquadest, mencit diukur kadar gula darah bagian ekornya menggunakan glukometer.
3. Kelompok I (kontrol), diberi aquadest; kelompok II diberi larutan glukosa. Semua pemberian dilakukan secara per oral.
4. Pada menit ke- 15, 30, 60, 90, 120 setelah pemberian, dilakukan pengukuran kadar gula darah menggunakan glukometer.
5. Catat kadar gula darah mencit menggunakan tabel. Hitung AUC untuk kelompok kontrol dan kelompok induksi glukosa. Buat grafik sumbu X waktu pengukuran (menit vs rerata kadar gula darah).

Tabel 8. Kadar gula darah mencit selama _____ menit

Menit ke-	Kontrol				Induksi Glukosa			
	1	2	3	$\bar{x}$	1	2	3	$\bar{x}$
0								
15								
30								
60								
90								
120								
AUC								

Soal Diskusi:

1. Apa pengertian hipoglikemia dan hiperglikemia?

2. Apa perbedaan DM tipe 1 dan tipe 2?
3. Apa pengertian kadar glukosa darah puasa dan *post loading* glukosa?
4. Apa pengertian, kelebihan dan kekurangan UTGO
5. Bagaimana mekanisme terjadinya hiperglikemia?
6. Berapa kadar gula darah normal pada mencit?

PERCOBAAN 6

EFEK ANTIDIABETES EKSTRAK SAMBILOTO PADA HEWAN UJI

Tujuan:

Menganalisis efek obat antidiabet oral metformin dan ekstrak herbal sambiloto dengan melihat dan mengamati serta menentukan jumlah penurunan kadar glukosa pada hewan uji.

Dasar Teori:

Hiperglikemia adalah suatu kondisi medik berupa peningkatan kadar glukosa dalam darah yang melebihi batas normal. Hiperglikemia berupa salah satu tanda khas penyakit diabetes melitus (DM), meskipun juga mungkin didapatkan pada beberapa keadaan yang lain. Klasifikasi DM dapat dibedakan menjadi beberapa tipe yakni tipe 1, tipe 2, tipe lain dan diabetes melitus gestasional.

Daun sambiloto merupakan salah satu jenis obat herbal yang telah diteliti mampu menurunkan kadar glukosa dalam darah. Kandungan utama berupa *Andrographolide* yang memiliki mekanisme meningkatkan penggunaan glukosa otot pada tikus yang dibuat dalam kondisi diabetes, sehingga menurunkan kadar glukosa plasma tikus.

Bahan dan Alat Percobaan:

Mencit	Sprit oral kecil (untuk mencit)
Timbangan hewan	Glukometer dan strip
Larutan glukosa 5% 1g/kgBB mencit secara p.o.	Stopwatch
Aquades dosis 25 g/kgBB, pemberian 0,5 ml/ 20 gBB	
Ekstrak sambiloto 2% dosis 1,86 mg/20gBB secara p.o.	

Cara Kerja:

1. Enam (6) ekor mencit dibagi dalam 3 subkelompok @2 ekor mencit. Kelompok I sebagai kontrol negatif, kelompok II sebagai kelompok induksi ekstrak sambiloto.
2. Sebelum pemberian glukosa, ekstrak sambiloto maupun aquades, mencit diukur kadar gula darah bagian ekornya menggunakan glukometer.
3. Kelompok I (kontrol), diberi aquades; kelompok II diberi larutan glukosa. Setelah 10 menit pembebanan glukosa, kelompok II diberikan ekstrak sambiloto.
4. Pada menit ke- 15, 30, 60, 90, 120 setelah pemberian, dilakukan pengukuran kadar gula darah menggunakan glukometer.
5. Catat kadar gula darah mencit menggunakan tabel. Hitung AUC untuk kelompok kontrol dan kelompok induksi ekstrak sambiloto. Buat grafik sumbu X waktu pengukuran (menit vs rerata kadar gula darah).

Tabel 9. Data pengamatan kadar glukosa darah mencit metode pembebanan glukosa

Menit ke-	Kontrol				Induksi Glukosa				Induksi Ekstrak Sambiloto			
	1	2	3	$\bar{x}$	1	2	3	$\bar{x}$	1	2	3	$\bar{x}$
0												
15												
30												
60												
90												
120												
AUC												

Soal Diskusi:

1. Jelaskan mekanisme herbal sambiloto dalam menurunkan kadar glukosa darah!

PERCOBAAN 7

TONIKUM

Tujuan:

Untuk mengetahui efek tonikum pada hewan uji dengan metode *natatory exhaustion*.

Dasar Teori:

Penggunaan obat penambah stamina pada era sekarang ini makin meluas. Pola kerja aktivitas yang semakin meningkat membutuhkan tenaga yang lebih banyak, sehingga dapat menyebabkan kelelahan, karena itu kebutuhan akan obat penambah stamina menjadi meningkat seiring banyaknya Masyarakat menginginkan segera pulihnya tenaga mereka dalam waktu sesingkat mungkin agar mereka bisa meneruskan aktivitas sehari-hari.

Tonikum adalah suatu bahan atau campuran bahan yang dapat memperkuat tubuh atau tambahan tenaga atau energi pada tubuh. Tonikum dapat meregang atau memperkuat system fisiologi tubuh sebagaimana halnya olahraga yang dapat memperkuat otot-otot, yaitu dengan meningkatkan kelenturan alami, system pertahanan tubuh. Kelenturan tubuh inilah yang akan menentukan berbagai tanggapan (respon) tubuh terhadap tekanan dari luar maupun dari dalam. Semakin lentur pertahanan tubuh maka semakin besar pula kemampuan untuk melenting Kembali dari setiap jenis tekanan atau cidera (Anonim, 2010).

Bahan dan Alat Percobaan:

Mencit	Sprit oral kecil (untuk mencit)
Timbangan hewan	Rotarod/ <i>natatory exhaust</i>
Suplemen hemaviton stamina plus 0,08% dengan dosis 0,104 mg/20gBB	Stopwatch
Aquadest dosis 25 g/kgBB, pemberian 0,5 ml/ 20 gBB	

Cara Kerja:

1. Enam (6) ekor mencit dibagi dalam 2 subkelompok @3 ekor mencit. Kelompok I sebagai kontrol negatif, kelompok II sebagai kelompok yang diberi Hemaviton Stamina Plus 0,08%
2. Hewan uji dipuasakan terlebih dahulu selama 12-18 jam dengan tetap diberi air minum ad libitum.
3. Sebelum diberi perlakuan, hewan uji direnangkan dalam reservoir sampai timbul kelelahan dengan tanda hewan uji menunjukkan kepalanya ke di bawah permukaan air. Ketahanan berenang diukur berdasarkan waktu mencit mulai berenang sampai tenggelam, yaitu mencit berada dibawah permukaan air selama 4-5 detik. Waktu timbul kelelahan tersebut dicatat.
4. Hewan uji diistirahatkan selama 30 menit, dan diberi perlakuan pada masing-masing kelompok.
5. Tiga puluh (30) menit kemudian hewan uji direnangkan Kembali dan dicatat waktu perpanjangan reaksi, yakni selisih waktu timbulnya Lelah pada hewan uji setelah pemberian sediaan dan sebelum pemberian sediaan.

6. Catat waktu lama renang mencit sebagai data, buat grafik sumbu X kelompok perlakuan (sebelum dan sesudah perlakuan) vs rata-rata waktu bertahan berenang mencit (detik).

Tabel 3. Data pengamatan sebelum dan sesudah perlakuan

Kelompok	Mencit	Waktu (menit, detik)		Rerata Waktu
		Sebelum Perlakuan	Sesudah Perlakuan	
Kontrol	1			
	2			
	3			
Hemaviton	1			
	2			
	3			

PERCOBAAN 8

UJI EFEK *Nigella sativa*

Tujuan:

Untuk mengetahui efek *Nigella sativa* (jinten hitam) sebagai tonik hewan uji.

Dasar Teori:

Nigella sativa merupakan tanaman yang berasal dari famili *Ranunculaceae* yang sudah banyak dilakukan penelitian. Potensi farmakologis yang luas dari tumbuhan herbal tersebut mulai dari biji dan minyak biasanya digunakan sebagai tonik dan obat tradisional untuk berbagai macam penyakit.

Bahan dan Alat Percobaan:

Mencit	Sprit oral kecil (untuk mencit)
Timbangan hewan	Rotarod/ <i>activity cage</i>
<i>Nigella sativa</i> 2,5% dosis 3,12 mg/20gBB	Stopwatch
Aquadest dosis 25 g/kgBB, pemberian 0,5 ml/ 20 gBB	

Cara Kerja:

1. Enam (6) ekor mencit dibagi dalam 2 subkelompok @3 ekor mencit. Kelompok I sebagai kontrol negatif, kelompok II sebagai kelompok yang diberi Hemaviton Stamina Plus 0,08%
2. Hewan uji dipuaskan terlebih dahulu selama 12-18 jam dengan tetap diberi air minum ad libitum.
3. Sebelum diberi perlakuan, hewan uji direnangkan dalam reservoir sampai timbul kelelahan dengan tanda hewan uji menunjukkan kepalanya ke di bawah permukaan air. Ketahanan berenang diukur berdasarkan waktu mencit mulai berenang sampai tenggelam, yaitu mencit berada dibawah permukaan air selama 4-5 detik. Waktu timbul kelelahan tersebut dicatat.
4. Hewan uji diistirahatkan selama 30 menit, dan diberi perlakuan pada masing-masing kelompok.
5. Tiga puluh (30) menit kemudian hewan uji direnangkan Kembali dan dicatat waktu perpanjangan reaksi, yakni selisih waktu timbulnya Lelah pada hewan uji setelah pemberian sediaan dan sebelum pemberian sediaan.
6. Catat waktu lama renang mencit sebagai data, buat grafik sumbu X kelompok perlakuan (sebelum dan sesudah perlakuan) vs rata-rata waktu bertahan berenang mencit (detik).

Tabel 11. Data pengamatan uji efek *Nigella sativa*

Kelompok	Mencit	Waktu (menit, detik)		Rerata Waktu
		Sebelum Perlakuan	Sesudah Perlakuan	
Kontrol	1			
	2			
	3			
<i>Nigella sativa</i>	1			
	2			
	3			

PERCOBAAN 9

UJI TOKSISITAS AKUT PADA HEWAN UJI

Tujuan:

1. Menentukan LC50-24 jam senyawa uji pada ikan guppy (*Poecilia reticulata*) melalui uji toksisitas akut berbasis paparan dalam air.
2. Melatih mahasiswa melakukan analisis kuantitatif toksisitas dengan menghitung LC50 menggunakan berbagai metode serta membandingkan hasil antar metode.

Dasar Teori:

Uji toksisitas akut pada ikan bertujuan menilai efek merugikan suatu senyawa dalam paparan jangka pendek, terutama melalui parameter mortalitas. Pada organisme akuatik, paparan umumnya dilakukan melalui media air, sehingga ukuran toksisitas yang digunakan adalah LC50 (*Lethal Concentration 50%*), yaitu konsentrasi dalam air yang menyebabkan kematian 50% hewan uji pada durasi pengamatan tertentu. Dalam pedoman baku OECD Test Guideline 203 (*Fish, Acute Toxicity Test*), ikan dipajan terhadap bahan uji selama 96 jam dan mortalitas serta abnormalitas dicatat minimal pada 24, 48, 72, dan 96 jam, lalu ditentukan LC50-96h.

Pedoman OECD TG 203 juga menekankan desain paparan yang reproduktibel: bahan uji diberikan pada ≥ 5 konsentrasi dalam deret geometri (faktor disarankan $\leq 2,2$), dengan minimal 7 ikan per konsentrasi dan kontrol. Validitas uji dinilai antara lain dari mortalitas kontrol yang tidak melebihi 10% pada akhir pengamatan serta kondisi kualitas air (mis. oksigen terlarut memadai).

Pada praktikum ini, protokol TG 203 diadaptasi menjadi pengamatan hingga 24 jam, sehingga hasil yang dilaporkan adalah LC50-24h. Adaptasi ini tetap mempertahankan prinsip utama *fish acute toxicity test* (paparan melalui air, konsentrasi bertingkat, dan evaluasi mortalitas), namun penting untuk selalu mencantumkan durasi pada parameter LC50 yang dihitung.

Ikan guppy (*Poecilia reticulata*) sering digunakan sebagai organisme uji toksisitas air tawar dan telah digunakan dalam studi toksisitas akut yang menghitung LC50 dengan rancangan uji yang merujuk pedoman OECD. Dalam praktikum, pemilihan ikan berukuran relatif seragam dan sehat serta pengendalian kondisi air membantu mengurangi variasi respons yang tidak terkait dengan bahan uji.

Hasil uji toksisitas akut pada praktikum ini dinyatakan dalam dua tolok ukur, yaitu tolok ukur kuantitatif dan tolok ukur kualitatif. Tolok ukur kuantitatif yang digunakan adalah LC50-24 jam (*Lethal Concentration 50%*), yaitu konsentrasi senyawa uji dalam media air (mg/L) yang menyebabkan kematian 50% ikan guppy dalam waktu pengamatan 24 jam. Karena hewan uji adalah ikan dan pajanan dilakukan melalui air (*waterborne exposure*), maka parameter yang digunakan adalah LC50, bukan LD50 (mg/kg).

Tolok ukur kualitatif berupa tanda-tanda keracunan yang dapat diamati selama pemaparan, seperti perubahan pola berenang (hiperaktif/acak/berputar), penurunan aktivitas (lemas/diam di dasar), kehilangan keseimbangan, respons terhadap rangsang menurun, gasping di permukaan/gerak operkulum meningkat (tanda gangguan respirasi), perubahan warna tubuh,

dan produksi mukus meningkat. Tolok ukur kualitatif ini membantu menafsirkan awal munculnya efek toksik dan memperkaya diskusi mekanisme toksik yang mungkin terjadi.

Nilai LC₅₀-24h diturunkan secara statistik dari hubungan konsentrasi–respon (mortalitas) dan dihitung menggunakan beberapa pendekatan, yaitu metode grafik Miller–Tainter (probit–log), metode Litchfield–Wilcoxon, dan metode Farmakope Indonesia (FI IV) berbasis log-konsentrasi. Secara umum, semakin kecil nilai LC₅₀, semakin tinggi toksisitas (lebih poten mematikan pada konsentrasi rendah). Berdasarkan nilai LC₅₀-24h yang diperoleh, potensi toksisitas akut senyawa uji dapat dikelompokkan ke dalam kategori toksisitas untuk memudahkan interpretasi hasil praktikum.

Secara umum semakin kecil nilai LC₅₀, semakin rendah toksisitasnya. Dari harga LC₅₀ yang diperoleh, selanjutnya potensi ketoksikan akut senyawa uji dapat digolongkan berdasarkan EPA:

Tabel 12. Kategori potensi ketoksikan akut

No.	Kategori	LC ₅₀ (mg/L)
1	<i>Very highly toxic</i>	< 0,1
2	<i>Highly toxic</i>	> 0,1 -1
3	<i>Moderately toxic</i>	> 1 - 10
4	<i>Slightly toxic</i>	> 10 – 100
5	<i>Practically nontoxic</i>	> 100

Sumber: “*Categories of Toxicity for Aquatic Organisms*” (Appendix I) dari dokumen EPA.

Bahan dan Alat Percobaan:

Ikan guppy (<i>Poecilia reticulata</i>) ukuran relatif seragam 60 ekor	Label & spidol permanen
Dalmat 50 EC (50 g/L)	Aerator + batu aerasi (6)
Wadah uji: 6 buah	Termometer air
labu ukur untuk pembuatan seri konsentrasi	Serok/jaring kecil
Stopwatch/timer	Micropipet

Cara Kerja:

- Enam puluh (60) ekor ikan guppy dibagi dalam 6 kelompok perlakuan
 - Kontrol : 0 µg/L
 - C1 : 2 µg/L
 - C2 : 4 µg/L
 - C3 : 8 µg/L
 - C4 : 16 µg/L
 - C5 : 32 µg/L
- Siapkan 6 wadah uji dan beri label: Kontrol, C1, C2, C3, C4, C5. Isi masing-masing wadah dengan volume air yang sama dan pasang aerator pada setiap wadah dengan aliran yang seragam.
- Buat stok kerja (Stock-1000) dari Dalmat 50 EC dengan cara mencampurkan 100 µL Dalmat 50 EC ke dalam air hingga 100 mL, lalu homogenkan.

- Siapkan larutan uji pada masing-masing wadah (konsentrasi akhir deltamethrin ekuivalen): C1 = 2 µg/L, C2 = 4 µg/L, C3 = 8 µg/L, C4 = 16 µg/L, C5 = 32 µg/L, Kontrol = 0 µg/L. Tambahkan Stock-1000 sesuai kebutuhan dan aduk perlahan sampai homogen.
- Masukkan 10 ekor ikan guppy sehat dan ukuran relatif seragam ke masing-masing wadah (total 60 ekor), lalu catat waktu sebagai T0 (mulai pajanan).
- Lakukan pengamatan dan catat jumlah ikan mati pada 1 jam, 2 jam, 3 jam, dan 24 jam. Ikan dinyatakan mati bila tidak ada gerak operkulum/insang dan tidak merespons rangsang ringan.
- Pada 24 jam, hitung % mortalitas tiap konsentrasi, lakukan koreksi 0% dan 100% bila diperlukan, lalu hitung LC50-24 jam menggunakan metode Miller–Tainter, Litchfield–Wilcoxon, dan Farmakope Indonesia (FI IV) sesuai lembar kerja perhitungan.
- Buat grafik/rekap untuk analisis: (a) konsentrasi vs % mortalitas 24 jam, dan (b) log konsentrasi vs probit (untuk metode grafik), kemudian simpulkan nilai LC50-24 jam serta bandingkan hasil dari ketiga metode.

Tabel 13. Mortalitas ikan guppy – pengamatan 1 jam, 2 jam, 3 jam, 24 jam

Kelompok	Konsentrasi (µg/L)	<i>n</i>	Mati 1 jam	Mati 2 jam	Mati 3 jam	Mati 24 jam	% mati 24 jam
Kontrol		10					
C1		10					
C2		10					
C3		10					
C4		10					
C5		10					

A. Litchfield & Wilcoxon → log konsentrasi vs % mortalitas (24h)

Tabel 14. Litchfield-Wilcoxon (LC50-24jam)

Kelompok	Konsentrasi (µg/L)	Log Konsentrasi (x)	% Kematian 24 jam (y)
Kontrol			
C1			
C2			
C3			
C4			
C5			

Catatan:

- Log yang dipakai: **log10**
- Kalau ada 0% atau 100%, untuk keperluan garis regresi kamu boleh pakai corrected % (lihat tabel Miller–Tainter).

B. Miller and Tainter → log konsentrasi vs probit (24 jam)

Tabel 15. Miller-Tainter (LC50-24 jam)

Kelompok	Konsentrasi (µg/L)	Log Konsentrasi (x)	% Kematian 24 jam	Corrected %	Probits (y)
----------	--------------------	---------------------	-------------------	-------------	-------------

Kontrol					
C1					
C2					
C3					
C4					
C5					

Rumus Corrected % untuk mortatilas 0% dan 100%

Untuk 0% kematian : $100 \times (0,25/n)$

Untuk 100% kematian : $100 \times ((n-0,25)/n)$

n = number of death

Tabel 4. Transformation of percentage mortalities of probits (Miller and Tainter, 1944)

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

C. Thompson-Weil

Tabel 17. Thompson-Weil

Kelompok	Konsentrasi ($\mu\text{g/L}$)	Jumlah Kematian
Kontrol		
C1		
C2		
C3		
C4		
C5		

$$\text{Log } M = \text{Log } D + d(f+1)$$

Dimana:

M : nilai LD_{50}

D : dosis terendah yang digunakan

d : log r (kelipatan dosis)

f : faktor Thompson-Weil

D. Farmakope Indonesia IV $\rightarrow$ log konsentrasi dan Σp_i

Tabel 18. Farmakope Indonesia IV (LC_{50} -24 jam)

Konsentrasi (µg/L)	Log Konsentrasi	d _i (mati 24 jam)	p _i = d _i /n
Kontrol			
C1			
C2			
C3			
C4			
C5			
Σ p _i			

$$m = a - b (\sum p_i - 0,5)$$

dimana:

$$m = \log LC50$$

a = log konsentrasi terkecil yang masih menyebabkan 100% kematian
(jika ada; bila tidak ada 100%)

b = beda log konsentrasi berurutan

p_i = proporsi kematian pada tiap konsentrasi (d_i/n)

PERCOBAAN 10

TOLAK UKUR KUALITATIF TOKSISITAS

Tujuan:

1. Mengidentifikasi dan mendeskripsikan tanda-tanda keracunan pada ikan guppy setelah pajanan deltamethrin dalam air.
2. Membandingkan pola dan derajat gejala antar kelompok konsentrasi (kontrol vs C1–C5) selama 24 jam.

Dasar Teori:

Pada uji toksisitas akut ikan, selain mortalitas untuk menghitung LC50, pedoman uji juga menekankan pentingnya pencatatan abnormalitas yang tampak (*visible abnormalities*) terkait penampilan dan perilaku selama periode paparan. Pencatatan tanda-tanda keracunan ini berfungsi sebagai tolak ukur kualitatif untuk menggambarkan onset dan pola gangguan fisiologis sebelum kematian terjadi, serta membantu interpretasi mekanisme toksik yang mungkin dominan.

Pada uji toksisitas akut ikan, selain mortalitas untuk menghitung LC50, pedoman uji juga menekankan pentingnya pencatatan abnormalitas yang tampak (*visible abnormalities*) terkait penampilan dan perilaku selama periode paparan. Pencatatan tanda-tanda keracunan ini berfungsi sebagai tolak ukur kualitatif untuk menggambarkan onset dan pola gangguan fisiologis sebelum kematian terjadi, serta membantu interpretasi mekanisme toksik yang mungkin dominan.

Dalam praktikum ini, bahan uji adalah deltamethrin, insektisida golongan piretroid yang bersifat neurotoksik. Pada ikan, piretroid dapat menimbulkan gangguan sistem saraf yang tampak sebagai perubahan perilaku berenang (hiperaktif, tidak terarah, berputar), kehilangan keseimbangan, dan penurunan respons terhadap rangsang. Gangguan saraf ini dapat disertai tanda gangguan respirasi seperti gerak operkulum meningkat dan gasping di permukaan, serta peningkatan mukus/produksi lendir sebagai respons stres pada insang.

Bahan dan Alat Percobaan:

Ikan guppy (<i>Poecilia reticulata</i>) ukuran relatif seragam 60 ekor	Label & spidol permanen
Dalmat 50 EC (50 g/L)	Aerator + batu aerasi (6)
Wadah uji: 6 buah	Termometer air
labu ukur untuk pembuatan seri konsentrasi	Serok/jaring kecil
Stopwatch/timer	Micropipet

Cara Kerja:

1. Gunakan wadah yang sama dari Percobaan 9 (Kontrol + C1–C5, masing-masing 10 ekor). Pastikan label jelas dan kondisi wadah tetap sama (aerasi, volume, suhu ruangan).
2. Lakukan observasi baseline singkat (sebelum pajanan atau segera setelah T0) selama 3–5 menit untuk memastikan ikan berenang normal.

3. Lakukan observasi kualitatif pada waktu 1 jam, 2 jam, 3 jam, dan 24 jam. Pada setiap timepoint:
 - a. Amati tiap wadah selama 3–5 menit (usahakan tanpa mengetuk/mengejutkan ikan).
 - b. Amati tiap wadah selama 3–5 menit (usahakan tanpa mengetuk/mengejutkan ikan).
 - c. Jika ada ikan mati, catat waktu kematian dan gejala yang tampak sebelum mati (bila sempat diamati).
4. Setelah selesai 24 jam, rekap per kelompok: jumlah ikan pada tiap skor (0–3), jumlah kematian, dan ringkasan gejala dominan. Data ini dipakai untuk diskusi pola toksisitas konsentrasi–respon (bukan untuk LC50).

Tabel 5. Rekap skor per kelompok per waktu

Kelompok	<i>n</i>	Waktu	Skor 0	Skor 1	Skor 2	Skor 3	Mati
Kontrol	10	1 jam					
		2 jam					
		3 jam					
		24 jam					
C1	10	1 jam					
		2 jam					
		3 jam					
		24 jam					
C2	10	1 jam					
		2 jam					
		3 jam					
		24 jam					
C3	10	1 jam					
		2 jam					
		3 jam					
		24 jam					
C4	10	1 jam					
		2 jam					
		3 jam					
		24 jam					
C5	10	1 jam					
		2 jam					
		3 jam					
		24 jam					

Kode gejala keracunan:

- A** : berenang hiperaktif/gelisah (darting)
B : berenang tidak terarah/berputar
C : diam di dasar/aktivitas menurun (lemas)
D : kehilangan keseimbangan (miring/terbalik)
E : gasping di permukaan / operkulum sangat cepat (gangguan respirasi)
F : respons rangsang menurun (tidak menghindar saat disentuh air/pengaduk ringan)

G : perubahan warna tubuh / mukus meningkat / sirip menguncup

Skor toksisitas kualitatif:

- 0 = Normal (berenang normal, respons normal, respirasi normal)
- 1 = Ringan (A atau sedikit E; masih berenang stabil)
- 2 = Sedang (B/C/E jelas, respons menurun; masih bisa berenang tapi tidak stabil)
- 3 = Berat / pre-terminal (D nyata, imobil/nyaris tidak bergerak, gasping berat)

Mati dicatat terpisah (bukan skor 3).