



PETUNJUK PRAKTIKUM FARMAKOLOGI II



Tim Penyusun:

apt. Febriana Astuti, M. Farm

**PROGRAM STUDI D3 FARMASI
POLITEKNIK KESEHATAN TNI AU ADISUTJIPTO
YOGYAKARTA**

2022

VISI & MISI

POLITEKNIK KESEHATAN TNI AU ADISUTJIPTO YOGYAKARTA

VISI

Menjadi poltekkes yang unggul, mandiri, berkualitas dan modern serta kompetitif ditingkat nasional

MISI

1. .Menyelenggarakan pendidikan kesehatan untuk menghasilkan lulusan yang berkualitas, beriman dan bertaqwa.
2. Melaksanakan penelitian terapan di bidang kesehatan yang berguna bagi masyarakat.
3. Melaksanakan pengabdian masyarakat dan pemanfaatan iptek bidang kesehatan dan melaksanakan kerjasama dengan pihak terkait dalam rangka pengembangan dan kemandirian poltekkes.

VISI & MISI

PROGRAM STUDI D3 FARMASI

VISI

“Visi keilmuan program studi D3 Farmasi Poltekkes TNI AU Adisutjipto adalah menjadi program studi D3 Farmasi yang unggul dibidang pelayanan kefarmasian khususnya farmasi penerbangan pada tahun 2025”.

MISI

1. Menyelenggarakan pendidikan D3 farmasi untuk menghasilkan lulusan yang unggul dibidang pelayanan kefarmasian khususnya farmasi penerbangan.
2. Menyelenggarakan penelitian dibidang pelayanan kefarmasian yang berguna bagi masyarakat.
3. Menyelenggarakan pengabdian kepada masyarakat dan kerjasama dengan berbagai pihak dalam rangka pengembangan ilmu pengetahuan dibidang pelayanan kefarmasian.
4. Membentuk tenaga ahli madya farmasi yang memiliki keimanan dan ketaqwaan kepada Tuhan Yang Maha Esa serta sikap disiplin.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kita panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya dan meuntun kita dalam mengarungi Samudra ilmu-Nya yang tak terbatas. Shalawat dan slaam kita curahkan kepada junjungan kita, qudwah kita, rasul semestaalam Muhammad SAW hingga akhir zaman.

Buku petunjuk Praktikum Farmakologi II ini disusun sebagai alat bantu mahasiswa untuk memudahkan dalam praktikum Farmakologi II. Mahasiswa diharapkan dapat membaca dan memahami materi praktikum sehingga dapat melaksanakan praktikum dengan lancar dan tertib.

Penyusun berharap agar petunjuk ini bukanlah satu – satunya pedoman di dalam menjalankan praktikum, oleh karena itu adalah suatu keharusan bagi setiap mahasiswa untuk selalu membaca literatur – literatur yang berhubungan dengan ilmu farmasi.

Buku ini telah disusun dengan segala kelebihan dan kekurangannya, untuk itu kami mohon kritik dan saran untuk penyempurnaan buku petunjuk ini. Semoga buku petunjuk praktikum ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Yogyakarta, Maret 2022

DAFTAR ISI

Halaman Judul _____	1
Visi & misi Poltekkes TNI AU Adisutjipto Yogyakarta _____	2
Visi & Misi Program Studi D3 Farmasi _____	3
Kata Pengantar _____	4
Daftar Isi.....	5
Tata Tertib Pelaksanaan Praktikum _____	6
Percobaan I (Aktifitas obat antipiretik) _____	7
Percobaan II (Aktivita obat antiinflamasi) _____	12
Percobaan III (Aktivitas obat sistem syaraf pusat) _____	15
Percobaan IV (Aktivitas obat sistem syaraf perifer) _____	17
Percobaan V (Aktivitas obat terhadap system imun) _____	21
Percobaan VI (Efek toksik akut obat) _____	26
Daftar Pustaka _____	33

Tata Tertib Pelaksanaan Praktikum

1. Mahasiswa wajib hadir di ruang praktikum sesuai jadwal praktikum yang berlaku.
2. Mahasiswa yang datang terlambat lebih dari 15 menit tidak diperkenankan mengikuti kegiatan praktikum.
3. Mahasiswa wajib membawa farmasi kit disetiap kegiatan praktikum.
4. Mengikuti pretest sebelum praktikum dimulai.
5. Bila nilai pretest memenuhi standar (≥ 60) mahasiswa dapat mengikuti praktikum sesuai prosedur dan aturan yang berlaku (untuk mata praktikum tertentu).
6. Sebelum praktikum dimulai mahasiswa wajib mengenakan jas laboratorium.
7. Mahasiswa meminjam peralatan ke laboran dengan mengisi Daftar Bon Alat.
8. Selama praktikum berlangsung, mahasiswa wajib menjaga ketertiban dan ketenangan laboratorium.
9. Selama pelaksanaan praktikum mahasiswa tidak diperkenankan meninggalkan ruang praktikum tanpa ijin dosen atau asisten pembimbing praktikum.
10. Setelah selesai praktikum, mahasiswa wajib merapikan dan membersihkan kembali peralatan dan tempat praktikum sesuai ketentuan yang berlaku.
11. Mahasiswa wajib absen di jurnal praktikum dan mengisi kartu kendali praktikum.
12. Mahasiswa wajib membuang sampah praktikum sesuai ketentuan yang berlaku.
13. Mahasiswa wajib melaporkan alat-alat yang rusak dan pecah ke laboran.
14. Mahasiswa wajib mengganti peralatan yang rusak atau pecah sesuai dengan ketentuan yang berlaku.
15. Mahasiswa wajib membuat laporan resmi praktikum sesuai dengan hasil praktikum.

PERCOBAAN I

AKTIVITAS ANTIPIRETIK OBAT

A. Tujuan

Mahasiswa dapat mengevaluasi aktivitas antipiretik obat

B. Pendahuluan

Demam atau naiknya suhu tubuh pada umumnya terjadi karena adanya infeksi. Toksin yang dihasilkan oleh mikroorganisme akan mengganggu sistem pengaturan panas tubuh di hipotalamus. Selain dapat dipengaruhi oleh toksin dari mikroorganisme, sistem pengaturan panas tubuh dapat pula dipengaruhi oleh zat-zat lain yang bersifat toksik yang masuk ke dalam tubuh. Pada suhu di atas 37°C limfosit dan makrofag menjadi lebih aktif, dan apabila suhu melampaui $40-41^{\circ}\text{C}$ dapat terjadi situasi kritis yang bisa menjadi fatal dikarenakan tidak dapat dikendalikan lagi oleh tubuh.

Berdasarkan konsep-konsep di atas maka dikembangkan cara-cara untuk melakukan percobaan uji efektivitas antipiretik dari suatu obat. Dinitrofenol pada mulanya digunakan sebagai senyawa pembentuk panas dan obat untuk menurunkan berat badan. Ternyata dinitrofenol diketahui sangat toksik dan dapat menyebabkan katarak. Antipiretik adalah senyawa yang dapat menurunkan suhu tubuh dalam keadaan demam, salah satu contohnya adalah parasetamol. Antipiretik digunakan secara ekstensif dalam mengontrol pyrexia yang disebabkan oleh beberapa penyakit viral, malaria, malignancy, kerusakan jaringan, inflamasi dan tingkat penyakit lain. Untuk mengevaluasi antipiretik dalam mengatasi demam maka dilakukan percobaan hewan dengan menggunakan injeksi jamur Brewer atau lipopolisakarida-lipopolisakarida.

Test Antipiretik pada Tikus/Mencit: Pada mencit diberikan injeksi suspensi jamur Brewer secara sub cutan menghasilkan pyrexia yang signifikan yang dapat diatasi oleh obat-obat antipiretik yang efektif secara klinis.

Test Antipiretik pada Kelinci: Kelinci sangat sensitif terhadap efek pyrexigenik dari lipopolisakarida-lipopolisakarida yang dikandung oleh bakteri gram negatif-E. coli, diberikan secara intravena. Fraksi lipopolisakarida yang

menyebabkan kenaikan temperatur tubuh 1°C atau lebih pada dosis 0,1-0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ digunakan untuk penelitian lebih lanjut.

C. Metode Percobaan

1. Alat

Termometer rectal, timbangan hewan, alat pencatat waktu, spuit (1 ml dan 5 ml), dan oral sonde.

2. Bahan-bahan Larutan NaOH 0,1 N, CMC Na, Parasetamol, Alkohol 70%, Vaseline, 2,4 Dinitrofenol (DNF)

3. Hewan Percobaan Tikus

4. Pembuatan Larutan Obat

- Injeksi 2,4-dinitrofenol 0,5%

Cara Pembuatan Sebanyak 500 mg 2,4-dinitrofenol ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml, kemudian ditambahkan larutan NaOH 0,1 N sedikit demi sedikit sampai larut. Aquadest ditambahkan sampai garis tanda, cek pH = 6, dicukupkan dengan aquadest sampai 100 ml. Disaring, 5 tetes pertama dibuang dan tetesan selanjutnya ditampung.

- Suspensi Parasetamol 10%

Cara Pembuatan : CMC sebanyak 0,125 g ditaburkan ke dalam cawan porselin yang berisi aquadest panas sebanyak 1/3 bagian air yang tersedia. Didiamkan 30 menit. Diaduk sampai diperoleh massa yang homogen. Kemudian Parasetamol sebanyak 2,5 g digerus dalam lumpang sampai halus, mucilago CMC ditambahkan sedikit demi sedikit sambil digerus sampai homogen. Sisa aquadest ditambahkan sampai 25 ml, digerus kembali.

5. Tahap Percobaan

1. Hewan ditimbang dan diberi tanda.
2. Diukur suhu rata – rata 3 ekor tikus dengan termometer melalui rektal dengan selang waktu 5 menit sebanyak 3 kali, lalu dirata – rata.
3. Dihitung dosis 2,4 dinitrofenol 0,5% dosis 5 mg/KgBB, diberikan secara i.m.
4. Diukur kenaikan suhu tubuh tikus dengan selang waktu 5 menit sampai 20 menit.
5. Dihitung dosis dan diberikan:

- a. Mencit I : suspensi CMC Na 0,5% dosis 1% BB secara oral
 - b. Mencit II : suspensi parasetamol 10% dosis 400 mg/kgBB secara oral.
 - c. Mencit III : suspensi ibuprofen % dosis 400 mg/KgBB secara oral.
6. Diukur perubahan suhu yang terjadi dengan selang waktu 5 menit sampai 50 menit.
 7. Dibuat grafik suhu vs waktu.

DATA LAPORAN PERCOBAAN

Judul Percobaan :
 Tanggal Percobaan :
 Group :

a. Suhu Rata-Rata Mencit

No	Keterangan	Waktu (menit)	Suhu
1	Mencit 1 (CMC 1%)	5	
		10	
		15	
		Rata-Rata	
2	Mencit 2 (paracetamol)	5	
		10	
		15	
		Rata-Rata	
3	Mencit 3 (ibuprofen)	5	
		10	
		15	
		Rata-Rata	

b. Suhu Setelah Pemberian DNF

No	Keterangan	Waktu (menit)	Suhu
1	Mencit 1 (CMC 1%)	5	
		10	
		15	
		20	
2	Mencit 2 (paracetamol)	5	
		10	
		15	
		20	
3	Mencit 3 (Ibuprofen)	5	
		10	
		15	
		20	

c. Suhu Rata-Rata Mencit

No	Keterangan	Waktu (menit)	Suhu
1	Mencit 1 (CMC 1%)	5	
		10	
		15	
		20	
		25	
		30	
		35	
		40	
		45	
2	Mencit 2 (paracetamol)	5	
		10	
		15	
		20	
		25	
		30	

		35	
		40	
3	Mencit 3 (obat x)	5	
		10	
		15	
		20	
		25	
		30	
		35	
		40	
		45	

PERCOBAAN II

AKTIVITAS ANTIINFLAMASI OBAT

A. Tujuan

Mahasiswa dapat mengevaluasi aktivitas antiinflamasi obat.

B. Pendahuluan

Inflamasi merupakan suatu respon protektif normal terhadap luka jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik, zat kimia yang merusak, dan zat-zat mikrobiologik. Inflamasi adalah usaha untuk menginaktivasi atau merusak mikroorganisme yang menyerang, menghilangkan zat iritan, dan mengatur derajat perbaikan jaringan. Jika penyembuhan lengkap, proses peradangan biasanya reda. Inflamasi dicetus oleh pelepasan mediator kimiawi, (seperti prostaglandin, histamin dan leukotrien) dan migrasi sel (yang dicetus oleh sitokin pro-inflamasi). Proses inflamasi dikenal dengan lima tanda utama: panas (color), kemerahan (rubor), sakit (dolor), bengkak (tumor), dan kehilangan fungsi (loss of function). Berdasarkan lama terjadinya, inflamasi dapat dibagi menjadi dua jenis, yaitu: inflamasi akut dan inflamasi kronis. Inflamasi akut adalah reaksi pertahanan paling awal dari jaringan tubuh terhadap agen perusak, dan berakhir setelah beberapa jam atau hari. Penyebab inflamasi akut diantaranya adalah mikroba, reaksi hipersensitifitas, zat kimia, trauma fisik dan kerusakan jaringan. Sel-sel imun yang berperan dalam reaksi ini diantaranya adalah neutrofil, eosinofil dan mastosit. Sedangkan inflamasi kronis adalah reaksi inflamasi tubuh yang terjadi dalam jangka waktu yang lebih lama. Inflamasi kronis melibatkan banyak jenis sel imunitas, seperti sel fagosit mononuklear serta sel T limfosit.

Prostaglandin adalah mediator kimia utama yang terlibat dalam proses inflamasi, disamping mediator kimia lainnya, dan menjadi target kerja obat-obat antiinflamasi. Asam arakidonat adalah prekursor utama prostaglandin. Asam arakidonat dilepaskan dari jaringan fosfolipid oleh kerja phospholipase A2 dan asil hidrolase lainnya. Selanjutnya, dibiosintesis lagi dengan bantuan siklooksigenase (COX) menjadi eikosanoid. Terdapat dua isomer utama dari COX yang berperan dalam biosintesis prostaglandin, COX1 dan COX2. COX1 bersifat ada dimanamana, sedangkan yang kedua diinduksi dalam respon terhadap rangsangan inflamasi.

C. Metode Percobaan

1. Alat : Spuit, oral sonde, pletismometer manual atau digital
2. Bahan Larutan karagenan 1% dalam aquadest (**dibuat sehari sebelum percobaan**), CMC Na, suspensi obat deksametason 0,0015% dosis 0,045 mg/kgBB
3. Hewan Uji mencit
4. Tahap Percobaan
 - a. Mencit dipuaskan (tetap diberi air minum) sejak \pm 18 jam sebelum percobaan
 - b. Mencit ditimbang, lalu diberikan tanda pada sendi kaki belakang sebelah kiri untuk setiap mencit
 - c. Volume kaki mencit diukur dengan cara mencelupkan kaki yang telah ditandai sampai batas tanda yang telah diberikan ke alat pletismometer, lalu dilihat tinggi cairan pada alat (jika menggunakan pletismometer manual) atau nilai yang tertera di layar (jika menggunakan pletismometer digital). Nilai ini dinyatakan sebagai volume awal (V_0)
 - d. Mencit diberikan suspensi obat deksametason 0,0015% dosis 0,045 mg/kgBB, suspensi obat X 360 mg/kgBB dan suspensi CMC Na untuk mencit kontrol secara oral.
 - e. Pada menit ke-30 setelah pemberian obat, disuntikkan larutan karagenan 1% dengan volume 0,05 ml ke telapak kaki belakang kiri setiap mencit.
 - f. 30 menit kemudian, volume kaki yang telah disuntik karagenan diukur dan dicatat. Pengukuran dilakukan selama 3 jam dengan interval tiap 30 menit.
 - g. Catat hasil pengamatan dalam tabel, lalu untuk setiap tikus, hitung persentase radang dan persentase inhibisi radang yang terjadi untuk setiap titik waktu (30 menit, 60 menit, 90 menit dan seterusnya)

Rumus:

Untuk Persentase Radang (%R)

$$\%R = \frac{(V_t - V_0)}{V_0} 100\%$$

Untuk Persentase Inhibisi Radang (IR%)

$$\%IR = \frac{(\%R_{\text{kontrol}} - \%R_{\text{obat}})}{\%R_{\text{kontrol}}} 100\%$$

DATA LAPORAN PERCOBAAN

Judul Percobaan :
 Tanggal Percobaan :
 Group :

No	Keterangan	Berat	Vo	T= 20 menit			T=40 menit		
				Vt	%R	%IR	Vt	%R	%IR
1	Mencit control								
2	Mencit Obat A								
3	Mencit Obat B								

No	Keterangan	Berat	Vo	T= 60 menit			T=80 menit		
				Vt	%R	%IR	Vt	%R	%IR
1	Mencit control								
2	Mencit Obat A								
3	Mencit Obat B								

No	Keterangan	Berat	Vo	T= 2,5 jam			T= 3 jam		
				Vt	%R	%IR	Vt	%R	%IR
1	Mencit control								
2	Mencit Obat A								
3	Mencit Obat B								

PERCOBAAN III

AKTIVITAS OBAT TERHADAP SISTEM SARAF PUSAT

A. Tujuan

Mahasiswa dapat mengevaluasi aktivitas obat terhadap sistem saraf pusat.

B. Pendahuluan

Obat-obatan yang bekerja untuk sistem saraf pusat (SSP) merupakan salah satu yang pertama ditemukan manusia primitif dan masih digunakan secara luas sebagai zat farmakologi sampai sekarang. Beberapa golongan obat ini bersifat adiktif dan menyebabkan disfungsi berat baik bagi pribadi, sosial maupun ekonomi, maka perlu memberi batasan dalam penggunaan dan penyediaannya.

Cara kerja berbagai obat pada SSP tidak selalu dapat dijelaskan. Karena penyebab penyakit-penyakit yang dapat disembuhkannya (seperti skizofren, ansietas) belum seluruhnya dapat diketahui sehingga selama ini obat tersebut bersifat deskriptif. Pertama, jelas semua obat SSP bekerja pada reseptor khusus yang mengatur transmisi sinaps. Beberapa obat seperti anestetik umum dan alkohol dapat bekerja secara nonspesifik pada membran (meskipun pengecualian ini tidak sepenuhnya diterima) tetapi kerja tanpa melalui reseptor ini mengakibatkan perubahan-perubahan yang mencolok pada transmisi sinaps. Kedua, obat-obatan merupakan alat paling penting untuk mempelajari aspek fisiologi SSP mulai dari terjadinya bangkitan sampai pada penyimpanan memori jangka panjang, Ketiga, kerja obat dengan manfaat klinik yang nyata telah membawa hipotesa yang sangat menguntungkan mengenai mekanisme penyakit. Misalnya, informasi tentang obat antipsikotik pada reseptor memberikan dasar hipotesa tentang patologi skizofren. Kajian beberapa efek agonis dan antagonis reseptor asam gamma-aminobutirat (GABA) memberikan konsep baru tentang penyakit-penyakit termasuk ansietas dan epilepsi.

C. Metode Percobaan

1. Alat Spuit dengan oral sonde, restrainer mencit, stopwatch
2. Bahan Isoniazid, diazepam, NaCl 0,9%, air suling, CMC Na 0,5%. 4.3 Hewan Uji Hewan uji yang digunakan adalah mencit usia 2-3 bulan
3. Tahap Percobaan

1. Hewan ditimbang, dicatat dan ditandai pada ekornya b. Dihitung dosis dengan pemberian: - Mencit 1 : Kontrol aquadest dosis 1%/BB (i.p) - Mencit 2 : Diazepam [] 0,5 % dosis 20 mg/kgBB (i.p) - Mencit 3 : Diazepam [] 0,5 % dosis 25 mg/kgBB (i.p) 3. Diamati gejala yang terjadi pada mencit
2. Setelah 1 jam masing-masing mencit disuntikkan Isoniazid 2% dosis 400 mg/kgBB secara intraperitoneal, lalu diamati onset konvulsi (awal mula kejang), durasi proteksi selama 2 jam dan jumlah kematian selama 2 jam.

DATA LAPORAN PERCOBAAN

Judul Percobaan :
 Tanggal Percobaan :
 Group :

No	Perlakuan	Onset Konvulsi (menit)	Durasi Proteksi (menit)	Insiden Konvulsi (%)	Kematian dalam 2 jam
1	Kontrol				
2	Diazepam 20mg/KgBB				
3	Diazepam 25mg/KgBB				

	Diazepam								Isoniazid								
	5	10	15	20	25	30	35	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
Mencit 1																	
Mencit 2																	
Mencit 3																	

	Diazepam								Isoniazid								
	5	10	15	20	25	30	35	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
Mencit 1																	
Mencit 2																	
Mencit 3																	

PERCOBAAN IV

AKTIVITAS OBAT TERHADAP SISTEM SARAF PERIFER

A. Tujuan

Mahasiswa dapat mengevaluasi aktivitas obat yang memberikan efek terhadap sistem saraf simpatis dan parasimpatis.

B. Pendahuluan

Obat Kolinergik singkatnya disebut kolinergik juga disebut sebagai parasimpatomimetik, berarti obat yang bekerja menyerupai perangsangan saraf parasimpatis. Tetapi karena ada syaraf yang secara anatomis termasuk syaraf simpatis yang transmitornya asetilkolin maka istilah obat kolinergik lebih tepat daripada istilah parasimpatomimetik.

Obat Kolinergik dibagi dalam tiga golongan :

1. Setilkolin : dalam golongan ini termasuk asetilkolin, metakolin, karbakol, betanekol
2. Antikolinesterase : termasuk di dalamnya eserin (fisostigmin), prostigmin neostigmin), diisopropil-fluorofosfat (DFP), dan insektisid golongan organofosfat.
3. Alkaloid tumbuhan yaitu muskarin, pilokarpin, dan asetilkolin. Obat adrenergik juga disebut sebagai simpatomimetik yang sifatnya menyerupai efek yang ditimbulkan oleh susunan saraf simpatis.

Respon suatu organ otonom terhadap perangsangan saraf adrenergik bergantung pada jenis reseptor adrenergik yang dimiliki organ tersebut serta jenis organ itu sendiri. Misalnya mata, otot radial iris mata mempunyai reseptor α_1 , maka perangsangan saraf adrenergik akan menyebabkan kontraksi (midriasis), otot siliaris mata mempunyai reseptor β_2 , maka perangsangan saraf adrenergiknya relaksasi untuk melihat jauh (lemah). Mata adalah contoh suatu organ dengan berbagai fungsi sistem saraf otonom, yang dikontrol berbagai reseptor otonom. Kolinomimetik muskarinik menyebabkan kontraksi otot konstriktor pupil sirkular dan otot siliaris.

C. Metode Percobaan

1. Alat: Timbangan hewan (mencit), botol tetes, stopwatch, flashlight (senter), Jangka Sorong, LUV (kaca pembesar).
2. Bahan: Pilocarpin 1%, Atropin 1%
3. Hewan Mencit
4. Tahap Percobaan
 - 1) Diukur diameter mata normal kanan dan kiri mencit serta refleksnya terhadap cahaya sebanyak 3 kali dengan selang waktu 5 menit.
 - 2) Diberi tetes mata pilokarpin sebanyak 2 tetes pada mata kanan dan kiri.
 - 3) Diamati diameter pupil kedua mata mencit serta refleksnya terhadap cahaya selama 30 menit selang waktu 5 menit.
 - 4) Setelah 30 menit diberi tetes mata atropin sebanyak 2 tetes pada kedua mata.
 - 5) Diamati diameter pupil kedua mata mencit serta refleksnya terhadap cahaya selama 30 menit selang waktu 5 menit.
 - 6) Dibuat grafik diameter pupil vs waktu

DATA LAPORAN PERCOBAAN

Judul Percobaan :
Tanggal Percobaan :
Group :

Mencit Kontrol

No	Perlakuan	Waktu (menit)	Mata Kiri		Mata Kanan	
			D (mm)	Refleks	D (mm)	Refleks
1	Normal	5				
		10				
		15				
		Rata- Rata				
2	Pilocarpin	5				
		10				
		15				
		20				
		25				
		30				
		35				
		40				
		45				
		50				
		55				
		60				

Mencit dengan Pemberian Obat

No	Perlakuan	Waktu (menit)	Mata Kiri		Mata Kanan	
			D (mm)	Refleks	D (mm)	Refleks
1	Normal	5				
		10				
		15				
		Rata- Rata				
2	Pilocarpin	5				
		10				
		15				
		20				
		25				
		30				
		35				
		40				
		45				
		50				
		55				
		60				

PERCOBAAN V

AKTIVITAS OBAT TERHADAP SISTEM IMUN

A. Tujuan

Mahasiswa diharapkan dapat mengevaluasi aktivitas antialergi obat dengan metode anafilaksis kutan aktif.

B. Pendahuluan

Sel mastosit adalah sel yang inflamasi yang terdapat pada jaringan, berasal dari proliferasi dan diferensiasi sel hematopoietik sum-sum tulang. Sel ini berperan dalam merespon signal imunitas alami (innate immunity) dan juga imunitas dapat (adaptive immunity) dengan melepaskan mediator inflamasi, dengan reaksi yang cepat (immediate) ataupun reaksi yang bertahap (delay). Sel mastosit banyak dijumpai, terutama di dalam aliran darah atau di dalam jaringan-jaringan tubuh.

Mediator utama yang dilepaskan oleh sel mastosit dalam merespon adanya agen-agen asing berbahaya yang masuk ke dalam tubuh adalah histamin. Disamping berfungsi dalam proteksi dari serangan agen berbahaya yang masuk, histamin juga mempunyai efek lain, seperti pada kontraksi otot halus, pada sel-sel endotel, serta pada ujung saraf. Sel mastosit manusia mengandung lebih kurang 2 sampai 5 pg histamin per sel. Alergen spesifik sel T helper memainkan peranan yang penting dalam reaksi patogenesis hipersensitifitas Sel Th mengaktifkan reaksi kompleks imun (IgE-sel mast) yang mencetus rilisnya mediator poten dan meningkatkan penarikan sel-sel inflamasi. Anafilaksis adalah reaksi alergi merugikan yang terjadi secara cepat dan sistemik, mempengaruhi satu atau lebih organ tubuh. Reaksi anafilaksis dapat terjadi setelah paparan makanan yang mengandung protein, obat-obatan, racun serangga serta benda yang bersifat alergen. Reaksi anafilaksis dicetus oleh cross-linking antara Ig-E dan agregasi reseptor FcR1 pada permukaan sel mastosit dan basofil. Pada saat masuknya antigen, akan terjadi reaksi pengaktifan sel mastosit (melalui fragmen Ig-E yang menempel pada permukaan sel mastosit) sehingga terjadi rilis histamin yang ada di dalam sel mastosit. Jumlah histamin yang dirilis dalam respon ini sangat banyak sehingga tidak mampu dimetabolisme oleh enzim histaminase, kelebihan histamin ini akan menyebabkan gangguan fisiologis pada jaringan dan organ tubuh,

seperti bronkokonstriksi, dilatasi pembuluh darah, udem (pembengkakan pada kulit) kontraksi pada saluran pencernaan.

C. Metode Percobaan

Metode yang bisa digunakan untuk mengetahui aktivitas anti-alergi suatu senyawa atau bahan obat. Secara *in vivo*, model hewan yang tersensitisasi antigen yang berasal dari protein asing maupun antibodi, dapat digunakan sebagai hewan percobaan dapat digunakan sebagai model hewan. Penyuntikan antigen protein asing ke dalam tubuh hewan secara subkutan akan merangsang reaksi anafilaksis kutan aktif, penyuntikan larutan Evans blue setelah sensitisasi (7 sampai 14 hari) akan memunculkan bentolan yang berwarna biru pada daerah sensitisasi tersebut.

Penyuntikan antibodi ke tubuh hewan secara subkutan akan mencetuskan reaksi anafilaksis kutan pasif, setelah masa laten (24 sampai 72 jam), penyuntikan berulang antibodi dengan Evans blue menyebabkan munculnya bentolan biru pada daerah sensitisasi. Rilis histamin dari sel mastosit juga dapat ditentukan dengan metode stabilitas sel mastosit secara *in vitro*, kemampuan suatu senyawa atau bahan obat dalam menghambat degranulasi mastosit dapat diamati secara mikroskopik. Kadar histamin yang dihasilkan juga dapat ditentukan dengan metode spektrofotometri. Namun, pengujian secara *in vitro* jarang dilakukan dalam skala praktikum, sebab proses dan preparasi bahan-bahan serta sample sel dan histamin yang relatif rumit.

Obat Antihistamin (Antialergi) Berdasarkan mekanisme kerjanya, antihistamin dapat dibedakan menjadi tiga golongan yaitu antagonis reseptor histamin, inhibitor pelepasan histamin dan anti-IgE.

1. Antagonis reseptor histamin H₁ Golongan obat ini bekerja dengan cara menduduki reseptor histamin, sehingga menghambat efek fisiologis histamin. Contoh golongan obat ini adalah dexchlorofeniramin, difenhidramin, prometazin.
2. Penghambat pelepasan histamin golongan obat ini bekerja dengan cara menghalangi pelepasan histamin dari sel mastosit. Mekanisme aksi dari golongan obat ini adalah menghambat dan menurunkan influks Ca²⁺ ke dalam sel, serta menghambat aktivasi sel mastosit. Contoh golongan obat ini adalah natrium kromolin, natrium kromoglikat dan natrium nedokromil. c.

3. Anti IgE Pengobatan dengan menggunakan golongan obat ini relatif baru. Golongan obat ini adalah antibodi monoklonal dengan sasaran aksi kerjanya adalah IgE, yang bertanggung jawab dalam mengaktifkan sel mastosit untuk melepaskan histamin. Contoh golongan obat ini adalah antibodi monoklonal omalizumab.

1. Alat-alat

Timbangan hewan, spuit 1 mL, beaker glass 50 mL, erlenmeyer 50 mL, stopwatch, alat cukur, penggaris.

2. Bahan-bahan Ovalbumin, NaCl 0.9%, Metilen blue, CTM 1%, CMC Na

3. Hewan percobaan Tikus

4. Tahap Percobaan

- 1) Satu minggu sebelum praktikum, hewan ditimbang dan ditandai.
- 2) Hewan dibagi dalam beberapa kelompok.
- 3) Hewan disensitisasi secara aktif dengan injeksi suspensi ovalbumin dalam NaCl 0.9% sebanyak 0,6 ml secara i.p dan 3 hari selanjutnya dengan suspensi ovalbumin dalam NaCl 0,9% sebanyak 0,1 ml secara intraplantar.
- 4) Pada hari praktikum, hewan yang sudah disensitisasi dicukur bulu punggungnya lalu ditritmen dengan CTM 1% dengan dosis 6 mg/kg BB dan larutan ekstrak dengan dosis 100 mg/kg BB.
- 5) Satu jam berikutnya, hewan disuntik dengan larutan metilen blue sebanyak 0.2 mL, secara intravena melalui vena ekor.
- 6) Hewan disuntikan lagi dengan ovalbumin pada daerah sensitisasi awal secara subkutan.
- 7) Dilakukan pengamatan dengan interval waktu 30, 60 dan 80 menit.
- 8) Anafilaksis kutan aktif ditandai dengan munculnya benjolan yang berwarna biru pada area injeksi (punggung).
- 9) Hasil pengamatan diberikan skor seperti yang terdapat pada tabel berikut

DATA LAPORAN PERCOBAAN

Judul Percobaan :
Tanggal Percobaan :
Group :

Kelompok	Mencit	Panjang usus seluruhnya	Panjang usus yang dilalui marker
Suspensi Norit	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
	Rata-Rata		

Kelompok	Mencit	Panjang usus seluruhnya	Panjang usus yang dilalui marker
Oleum Ricini+Suspensi norit	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
	Rata-Rata		

Kelompok	Mencit	Panjang usus seluruhnya	Panjang usus yang dilalui marker
Ekstrak Tumbuhan	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
	Rata-Rata		

PERCOBAAN VI

ANALISIS EFEK TOKSISITAS AKUT OBAT PADA HEWAN UJI

A. Tujuan

Mahasiswa mampu memahami tujuan, sasaran, taat cara pelaksanaan, tolak ukur dan manfaat uji ketoksikan sesuatu obat.

B. Pendahuluan

Toksistas adalah kemampuan suatu bahan atau senyawa kimia untuk menimbulkan kerusakan pada saat mengenai bagian dalam atau permukaan tubuh yang peka. Untuk dapat mengetahui informasi efek toksik dari suatu obat atau bahan tertentu, maka dapat diperoleh dari percobaan menggunakan hewan uji sebagai model yang dirancang pada serangkaian uji toksistas yang meliputi uji toksistas akut oral, toksistas subkronis oral, toksistas kronis oral, teratogenesis, sensitisasi kulit, iritasi mata, iritasi akut dermal, iritasi mukosa vagina, toksistas akut dermal, dan toksistas subkronis dermal. Pemilihan uji tersebut, tergantung dari tujuan penggunaan suatu zat dan kemungkinan terjadinya risiko akibat pemaparan pada manusia.

Uji toksikologi dibagi menjadi 2 golongan yaitu uji ketoksikan tak khas dan uji ketoksikan khas. Uji ketoksikan tak khas adalah uji toksikologi yang dirancang untuk mengevaluasi keseluruhan atau spectrum efek toksik sesuatu senyawa pada aneka ragam jenis hewan uji. Termasuk uji ini adalah ketoksikan akut, subkronis dan kronis. Sedangkan uji ketoksikan khas adalah uji toksikologi yang dirancang untuk mengevaluasi secara rinci efek toksik suatu senyawa atas fungsi organ atau kelenjar tertentu pada hewan uji. Termasuk dalam uji ini adalah uji potensiasi, uji reproduksi, uji kemutagenikan, uji kekarzinogenikan, uji kulit dan maat serat uji perilaku.

Ketoksikan akut adalah derajat efek toksik suatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat setelah pemberiannya dalam dosis tunggal. Sedangkan uji ketoksikan akut adalah uji ketoksikan suatu senyawa yang diberikan dalam dosis tunggal pada hewan uji tertentu dan waktu pengamatannya selama 24 jam.

Tujuan utama uji ketoksikan akut adalah menetapkan potensi ketoksikan akut yakni kisaran dosis letal atau dosis toksik suatu obat pada satu jenis atau lebih hewan uji. Dalam uji ini data yang dikumpulkan berupa tolak ukur kuantitatif (kisaran dosis letal/toksik) dan tolak ukur kualitatif (gejala klinis, wujud dan

mekanisme efek toksik). Tolak ukur kuantitatif yang sering digunakan adalah kisaran dosis letal atau dosis toksik adalah letal dose (LD_{50}) yaitu dosis tunggal suatu senyawa secara statistic dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji. Ada tiga metode yang paling sering dipakai untuk menghitung harga LD_{50} yaitu metode grafik Lithfield & Wolcoxon, metode grafik probit logaritma Miller dan Tainter serta metode Thomson-weil.

Manfaat uji ketoksikan akut untuk mengevaluasi batas aman atau indeks terapi (LD_{50} / ED_{50}) suatu obat. Selain itu pengetahuan tentang potensi ketoksikan akut dapat dipakai untuk merancang uji ketoksikan kronis dan subkronis, maupun untuk memperkirakan dosis awal atau dosis terapi penelitian yang lain.

Tata cara Baku Pemberlakuan Uji Ketoksikan Akut

1. Pemilihan hewan uji

Hewan uji yang digunakan sekurang-kurangnya dua jenis hewanterdiri dari rodent dan nirrodent, baik jantan maupun betina, satu galur, dewasa sehat, berat seragam (variasi yang diperbolehkan kurang 10%).

2. Pengelompokkan hewan uji

Hewan uji terpilih selanjutnya diadaptasikan di laboratorium paling tidak selama satu minggu. Penimbangan berat badan dilakukan satu hari sebelum perlakuan. Hewan uji dibagi menjadi beberapa kelompok sesuai jumlah peringkat dosis senyawa yang akan diberikan, tambah kelompok control negatif.

3. Tata cara pemberian dosis sediaan hewan uji

Sekurang-kurangnya digunakan 3 dosis berbeda. Dosis dapat diperoleh dari literatur resmi. Dosis terendah adalah dosis tertinggi yang sama sekali tidak menimbulkan kematian, sedangkan dosis tertinggi adalah dosis terendah yang menimbulkan kematian 100 %. Dengan interval dosis yang mampu menghasilkan rentang toksisitas dan angka kematian. Dari data ini akan diperoleh suatu kurva dosis-respon yang dapat digunakan untuk menghitung nilai LD_{50} .

C. Metode Percobaan

1. Pengamatan

Masa pengamatan dilakukan selama 24 jam.

Kriteria pengamatan meliputi :

- Pengamatan fisik terhadap gejala klinis (Tabel 1.)

- Perubahan berat badan
- Jumlah hewan yang mati masing-masing kelompok uji
- Histopatologi seluruh organ

2. Analisis dan Evaluasi Hasil

Data gejala klinis yang nampak pada fungsi vital secara kualitatif dipakai untuk mengevaluasi mekanisme penyebab kematian. Data hasil pemeriksaan histopatologi digunakan untuk mengevaluasi spectrum efek toksik. Data jumlah hewan yang mati pada masing-masing kelompok secara kuantitatif digunakan untuk menghitung harga LD₅₀ mengikuti salah satu tata cara yang telah disebutkan dalam pendahuluan. Bila sampai batas volume maksimum yang boleh diberikan pada hewan uji, dosis yang diberikan tidak menimbulkan kematian hewan uji (sering ditemukan pada obat tradisional) maka dosis tertinggi tersebut dinyatakan sebagai LD₅₀ semu atau (LD₀).

Dari harga LD₅₀ yang diperoleh selanjutnya potensi ketoksikan akut senyawa hewan uji dapat digolongkan menjadi :

Tingkat Toksisitas	LD ₅₀ Oral (pada tikus)	Klasifikasi
1	≤ 1 mg/kg	Sangat toksik
2	1 – 50 mg	Toksik
3	50 – 500 mg	Toksik sedang
4	500 – 5000 mg	Toksik ringan
5	5 – 15 g	Praktis tidak toksik
6	≥ 15 g	Relative tidak membahayakan

3. Prosedur Praktikum

Alat dan Bahan

1. Hewan uji mencit 2 – 3 bulan, berat badan 20 – 50 gr
2. Timbangan analitik
3. Jarum suntik oral untuk mencit
4. S spuit dengan volume 1 ml
5. Peralatan bedah
6. Peralatan gelas
7. Pot salep

8. Formalin 10% (untuk uji histopatologi)
9. Larutan obat (Luminal)
10. Alcohol 70%
11. Aqua destilata
12. Natrium CMC

Cara Kerja

1. Hewan uji diadaptasikan dengan laboratorium 1 minggu sebelumnya
2. Pembuatan Natrium CMC 1%
 - a. Panaskan kurang lebih 200 ml air hingga mendidih
 - b. Timbang Na. CMC sebanyak 1 gr
 - c. Masukkan Na.CMC kedalam gelas beaker 300 ml kemudian tambahkan 50 ml air panas
 - d. Aduk campuran tersebut dengan mixer hingga homogen, ditandai dengan tidak nampaknya lagi serbuk berwarna putih dan campuran berupa seperti gel
 - e. Tambahkan air panas sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga volume larutan tersebut menjadi 100 ml, dinginkan.
3. Pembuatan suspense Luminal
 - a. Perhitungan Dosis Oral Luminal untuk mencit
 - b. Dosis maksimal Luminal untuk manusia = 200 mg sekali pakai dan seharusnya 600 mg.
 - c. Dibuat seri dosis Luminal dengan kelipatan 2 dimulai dengan dosis maksimalnya yaitu 200 mg kemudian 400 mg (2x200 mg), 800 mg (2x400mg) dan 1600 mg (2x800mg)
 - d. Dosis yang dipilih untuk membuat sediaan yaitu suspense Luminal dengan dosis 400 mg / 0,2 ml

Konversi dosis untuk mencit BB 20 g = Dosis Lazim x Faktor Konversi

$$= 400 \text{ mg} \times 0,0026 = 1,04 \text{ mg}$$

Untuk mencit dengan berat 30 g $= (30 \text{ g} / 20 \text{ g}) \times 1,04 \text{ mg} = 1,56 \text{ mg}$

Dosis ini diberikan dalam volume $= 0,2 \text{ ml}$

Dibuat larutan persediaan sebanyak $= 100 \text{ ml}$

Jumlah Luminal yang digunakan $= (100 \text{ ml} / 0,2 \text{ ml}) \times 1,56 \text{ mg}$
 $= 780 \text{ mg} = 0,78 \text{ g}$

$$\% \text{ kadar Luminal} = (0,78 \text{ g} / 100\text{ml}) \times 100\% = 0,78$$

% Jika akan digunakan tablet Luminal

Tablet Luminal tersedia dalam kadar 30 mg per-tabletnya, dikarenakan saudara akan membuat suspensi tablet Loperamid dengan kadar 0,78 % b/v atau 780 mg per 100 ml suspensi, maka untuk mendapatkan 780 mg Luminal anda membutuhkan Tablet Luminal sebanyak $780 \text{ mg} / 30 \text{ mg} = 26$ tablet.

Cara pembuatan suspensi Luminal 1,56 % b/v

- Ambil 26 tablet luminal lalu gerus hingga halus
- Masukkan serbuk luminal yang sudah halus kedalam erlenmeyer 100 ml
- Tambahkan sekitar 50 ml larutan Na.CMC, kocok hingga homogeny
- Lalu cukupkan volumenya hingga 100 ml dengan larutan Na.CMC 1%

Kelompok	Dosis Luminal untuk manusia	Volume pemberian untuk mencit berat 30 g
1	200 mg	0,1 ml
2	400 mg	0,2 ml
3	800 mg	0,4 ml
4	1600 mg	0,8 ml
kontrol	-	0,2 ml

4. Metode uji

- A. Mencit dikelompokkan secara acak kedalam 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 4 ekor.
- B. Kemudian tiap kelompok diberi perlakuan dimana
 - 1) Kelompok I sebagai kelompok kontrol diberikan Suspensi Luminal sebanyak 0,1 ml/30 g BB Mencit,
 - 2) Kelompok II diberi suspensi luminal sebanyak 0,2 ml/30 g BB Mencit,
 - 3) Kelompok III diberi suspensi Luminal sebanyak 0,4 ml/30 g BB Mencit
 - 4) Kelompok IV diberi suspensi Luminal sebanyak 0,8 ml/30 g BB Mencit.
 - 5) Dan kelompok V yaitu kelompok kontrol yang hanya diberikan Na.CMC 1% sebanyak 0,2 ml / 30 g BB mencit

- C. semua perlakukan secara oral
 - D. Mencit kemudian ditempatkan dan diamati efek toksisitas yang dapat terjadi pada kulit, bulu, mata, membran mukosa dan juga sistem pernafasan, sistem syaraf otonom, sistem syaraf pusat, aktivitas somatomotor serta tingkah laku. Selain itu, perlu juga pengamatan pada kondisi: gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, tidur dan koma.
 - E. Pengamatan dilakukan selama 2 jam untuk tanda-tanda toksisitas dan diamati selama 24 untuk jumlah mencit yang mati
5. Analisis Data
- A. Hasil pengamatan kemudian dicatat dan di hitung LD₅₀ untuk Luminal
 - B. Data gejala-gejala untuk mengevaluasi mekanisme penyebab kematian.
 - C. Data hasil pemeriksaan histopatologi untuk mengevaluasi spectrum efek toksik.

PENGAMATAN FISIK UJI KETOKSIKAN AKUT

Bahan :
 Hewan Uji :
 Kelamin :
 Tanggal mulai :
 Kelompok : Nomor : Berat :
 Sediaan : Jalur dosis

Pengadaan	Tanda / Gejala	Hari ke (+, -)						
		1	2	3	4	5	6	7
Perilaku	Perubahan sikap							
	Vokalisasi							
	Gelisah							
Gerakan	Menjilat							
	Menggaruk							
	Tremor							
	Menggeliat							

	Ataksia							
	Paralysis							
	Konvulsi							
Kereaktifan terhadap rangsang	Keberangasan							
	Kepasifan							
	Anesthesia							
	Hiperestesia							
Ukuran pupil	Miosis							
	Midriasis							
Sekresi	Salivias							
	Midriasis							
Nafas	Bradikardia							
	Dispnea							
Kulit	Kemerahan							
	Pucat							
	Oedema							
	Melepuh							
Rambut	Rontok							
	Tidak tumbuh							
	Tumbuh sebagian							
	Tumbuh rata							
Kondisi umum	Berat badan							
	Makan							
	Makan sedikit							
	Tidak makan							
	Kematian							

Daftar Pustaka

1. Arimura, A., Nagata, M., Watanabe, A., Nakamura, K., Takeuchi, M. dan Harada, M. 1990 Production of active and passive anaphylactic shock in the WBB6F1 mouse, a mast cell deficient strain. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 46(7), 739-742
2. Boyce, J.A., Fred Finkelman., William T. Shearer dan Donata Vercelli. 2003. Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*. 639-646.
3. Gupta, P.P., Srimal, R.C., Srivastava, M., Singh, K.L., Tandon, J.S., 1995. Anti-allergic activity of Arborescens, from *Nyctanthes arborescens*. *International Journal of Pharmacognosy* 33, 70–72.
4. Handayani, D., Aldi, Y dan Zurmiati. 2008. Uji Aktivitas Penghambatan Degranulasi Mastosit yang Tersensitisasi terhadap ekstrak Metanol Spon Laut *Acaethodendrilla* SP. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. Vol. 13, No. 1, 2008, halaman 1-7.
5. Kemp SF, Lockey RF. 2002. Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 110:341-8.
6. Leung, D dan Ledford, D. 2009. Anaphylaxis: Recent advances in assessment and treatment.
7. Park, S.W., Park, E.K. dan Kim, D.H. 2005. Passive Cutaneous Anaphylaxis-Inhibitory Activity of Flavanones from *Citrus unshiu* and *Poncirus trifoliata*. *Planta Medica*. 71(1): 24-27.
8. Shore, P.A., Burkhalter, A., Cohn Jr., V.H., 1959. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 127, 182–186.