

Masukan dapat kami terima paling lambat tanggal  
05 November 2023

Pemberian Masukan dapat dilakukan melalui link  
<https://bit.ly/Masukan-Farmakodinamik2023>

## **UJI FARMAKODINAMIK PRAKLINIK OBAT TRADISIONAL BERDASARKAN KELAS TERAPI**

### **A. AJUVAN PENGKELAT BESI TALASEMIA**

#### **1. Patofisiologi Pengkelat Besi Talasemia**

Talasemia merupakan penyakit kelainan darah genetik ditandai dengan gangguan sintesis hemoglobin (Hb). Penyakit ini ditandai dengan menurunnya atau tidak adanya sintesis rantai alfa ( $\alpha$ ) atau beta ( $\beta$ ) globin. Di samping itu, talasemia dapat terjadi karena defek sintesis rantai globin secara kualitatif.

Talasemia memiliki spektrum keparahan klinis yang luas. Talasemia dibagi menjadi talasemia mayor, intermedia, dan minor. Talasemia mayor menggambarkan individu yang memiliki anemia parah yang muncul di awal kehidupan dan membutuhkan transfusi darah seumur hidup dan pengkelat besi, sedangkan talasemia minor menggambarkan individu dengan anemia asimtomatik dan heterozigot dari talasemia. Kelompok ini tidak bergantung pada transfusi, tetapi memerlukan konseling genetik. Kelompok individu dengan talasemia intermedia memiliki spektrum klinis yang sangat bervariasi di antara talasemia mayor dan minor. (Viprakasit 2018)

Pemberian transfusi yang berulang menyebabkan kadar zat besi meningkat. Hal ini karena setiap unit darah yang ditransfusikan mengandung kurang lebih 200 mg zat besi, sedangkan tubuh tidak memiliki kemampuan untuk mengekskresikan zat besi dalam jumlah besar (Thuret, 2013). Kelebihan zat besi di dalam tubuh akan terakumulasi dan bersifat toksik (menyebabkan kematian sel, neoplasia, infeksi dan fibrosis) terhadap organ diantaranya hati, jantung, kelenjar pituitari, dan pankreas yang dapat mengakibatkan disfungsi organ (Yatmark et al., 2019). Satu-satunya cara untuk menghilangkan kelebihan zat besi di dalam tubuh untuk mengurangi pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat menimbulkan stress oksidatif adalah dengan pemberian pengkelat besi. (Al-mosawy, 2019). Pengkelat besi adalah sebuah agen yang dapat mengikat zat besi untuk dapat diekskresikan dari dalam tubuh. Pada penerapannya terhadap individu dengan talasemia, terdapat tiga obat yang umum digunakan yaitu deferoxamine yang diberikan secara injeksi, deferiprone dan deferasirox dalam bentuk sediaan oral (Maggio et al., 2011).

Penggunaan deferasirox, deferoxamine serta deferiprone pada wanita hamil masih menjadi suatu hal yang kontradiktif karena dikhawatirkan dapat menimbulkan efek teratogenik (Pinto *and* Gian, 2020).

Penelitian ajuvan pengkelat besi talasemia diperlukan untuk menemukan obat bahan alam yang dapat mengurangi kelebihan zat besi pada individu dengan talasemia yang dikombinasi dengan pengkelat/pengelat/kelasi besi (deferoxamine, deferiprone atau deferasirox). Tujuan penggunaan ajuvan pengkelat besi talasemia adalah untuk membantu mengurangi dosis, frekuensi dan durasi pemberian serta dapat mengurangi efek samping *overload* besi. Hal ini dapat membantu meningkatkan kualitas hidup individu dengan talasemia.

Uji farmakodinamik ajuvan pengkelat besi talasemia hanya dilakukan sebagai data dukung pelaksanaan uji klinik pada manusia.

## **2. Metodologi Pengujian**

### **a. Prinsip Uji**

Jika tersedia hewan uji standar dengan kondisi *iron overload* seperti pada kondisi talasemia akibat pemberian tranfusi darah maka digunakan hewan uji tersebut. Jika tidak tersedia, maka hewan uji diinduksi dengan pemberian *iron-overload* sesuai metode yang berlaku. Hewan uji dipastikan mengalami peningkatan kadar feritin dan kadar transferin yang kemudian ditetapkan sebagai *baseline*. Selanjutnya diberikan sediaan uji selama waktu tertentu dan diamati perubahan parameter uji. Dilakukan evaluasi signifikansi perubahan parameter uji yaitu parameter hematologi, kadar feritin dan kadar transferin sebelum dan sesudah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Selain itu, jika diperlukan dilakukan evaluasi terhadap kadar antioksidan, pengamatan histopatologi dan kadar besi organ dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

### **a. Metode Uji**

#### **1) Alat, bahan dan hewan uji**

- a) Alat: kandang hewan, *sputit* injeksi, sonde oral, timbangan, alat gelas, spektrofotometer.
- b) Bahan: iron dekstran, sediaan uji, pembawa dan pereaksi untuk menguji parameter pengkelat besi talasemia.

- c) Hewan uji yang digunakan adalah hewan model dengan kondisi *iron-overload* seperti pada kondisi talasemia akibat pemberian tranfusi darah. Apabila tidak tersedia dapat menggunakan tikus jantan galur Sprague-Dawley atau Wistar.

## 2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor tiap kelompok. Hewan uji yang digunakan berjenis kelamin jantan, dikelompokkan sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberikan pakan standar dan pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi kadar besi.
- b) Kontrol negatif (hewan uji *iron overload*) diberi pakan standar dan diberi juga pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi kadar besi serta dilakukan induksi *iron overload*.
- c) Kontrol positif (hewan uji *iron overload*) diberi pakan standar serta dilakukan induksi *iron overload*. Kontrol positif diberi juga obat pengkelat besi standar deferiprone atau deferasirox secara oral (konversi dosis terendah terapi manusia) yang dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- d) Kelompok perlakuan (hewan uji *iron overload*) diberi pakan standar dan dilakukan induksi *iron overload*. Kelompok perlakuan diberi juga obat pengkelat besi standar deferiprone atau deferasirox secara oral (konversi terendah dosis terapi manusia) yang dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji dan diikuti dengan pemberian sediaan uji beberapa lama setelah pemberian obat pengkelat standar yang mempertimbangkan faktor absorpsi, interaksi dan waktu pengosongan lambung (misalnya 30 menit setelah pemberian obat pengkelat standar). Pemberian sediaan uji minimal pada tiga kelompok dosis yang berbeda. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

## 3) Induksi hewan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

Induksi *iron overload* pada hewan uji dapat dilakukan dengan pemberian *iron dextran* dengan dosis akumulasi 60 mg/kg BB yang diberikan secara bertahap 3x20 mg/kg BB secara intravena atau pemberian *iron dextran* 100 mg/kg BB setiap hari selama 14 hari secara intraperitoneal atau pemberian 60 mg/kg BB secara oral tiap 3 hari sekali selama

28 hari atau sesuai dengan hasil uji pendahuluan.

Induksi dilakukan sampai didapatkan peningkatan kadar feritin dan transferin yang stabil ditunjukkan dengan peningkatan kadar feritin dan transferin individual hewan uji dengan minimal 1,5 kali kadar feritin dan transferin dari kelompok kontrol normal. Kadar tersebut digunakan sebagai kadar baseline.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. Pemberian sediaan uji per oral dilakukan setelah induksi *iron overload* berhasil. Sediaan uji diberikan secara per oral selama 28 hari atau lebih sesuai dengan tujuan pemberian. Pemberian senyawa induksi dan/atau prosedur induksi dapat tetap dilakukan sampai selesai pengujian sesuai uji pendahuluan dengan mempertimbangkan kesejahteraan hewan uji.

5) Pengukuran parameter ajuvan pengkelat besi talasemia

Parameter ajuvan pengkelat besi talasemia yang diukur adalah sebagai berikut:

- a) Dilakukan pengamatan berat badan minimal setiap minggu.
- b) Setelah induksi *iron overload* dinyatakan berhasil dilakukan pengukuran parameter hematologi, kadar feritin dan kadar transferin dengan metode yang sesuai.
- c) Pada hari ke-29 atau setelah pemberian sediaan uji terakhir dilakukan pengukuran parameter hematologi rutin (hemoglobin, hematokrit, trombosit, leukosit, eritrosit), kadar feritin dan kadar transferin.
- d) Pada hari ke-29 atau setelah pemberian sediaan uji terakhir dilakukan pengamatan histopatologi organ hati untuk menentukan secara kualitatif dan kuantitatif deposit besi dengan metode yang sesuai (misalnya menggunakan pulasan *Prussian Blue* (pulasan khusus untuk besi dalam organ atau jaringan tubuh) yang memperlihatkan jumlah sel Kupffer yang mengandung besi). Jika diperlukan, dapat dilakukan pula pengamatan histopatologi pada organ lain yaitu jantung, otak, ginjal dan limfa.

6) Evaluasi

Evaluasi dilakukan terhadap parameter yang telah ditentukan. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji yaitu parameter berat badan, hematologi, kadar feritin dan kadar transferin sebelum dan sesudah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Selain itu, dilakukan evaluasi terhadap histopatologi untuk

pengamatan deposit besi di hati dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi klinik sebagai pertimbangan utama selain signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

### **Daftar Pustaka**

- Maggio, A., Filosa, A., Vitrano, A., Aloj, G., Kattamis, A., Ceci, A., Fucharoen, S., Cianciulli, P., Grady, R. W., Prossomariti, L., Porter, J. B., Iacono, A., Cappellini, M. D., Bonifazi, F., Cassarà, F., Harmatz, P., Wood, J., & Glud, C. (2011). Iron chelation therapy in talasemia major: A systematic review with meta-analyses of 1520 patients included on randomized clinical trials. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 47(3), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2011.07.002>
- Mansi, K., Tabaza, Y., Aburjai, T., The iron chelating activity of *Gundelia tournefortii* in iron overloaded experimental rats, *Journal of Ethnopharmacology*, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113114>.
- Safitri, R. et al. (2017) Iron-chelating effect of *Caesalpinia sappan* extract under conditions of iron overload. CRC Press / Balkema.
- Safitri, R., Reniarti, L. and Delia, L. (2017) 'The Effect of *Sappan Wood Extract (Caesalpinia sappan)*, Wheat grass and Vitamin E Treatment on the Liver Structure of Iron overload of Rat (*Rattus norvegicus*) in The Veterinary Medicine International Conference 2017', *KnE Life Sciences*, pp. 497–512. doi: 10.18502/kls.v3i6.1159.
- Viprakasit, V., & Ekwattanakit, S. (2018). Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Talasemia. In *Hematology/Oncology Clinics of North America* (Vol. 32, Issue 2, pp. 193–211). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.11.006>

## **B. PENYEMBUH LUKA BAKAR TOPIKAL**

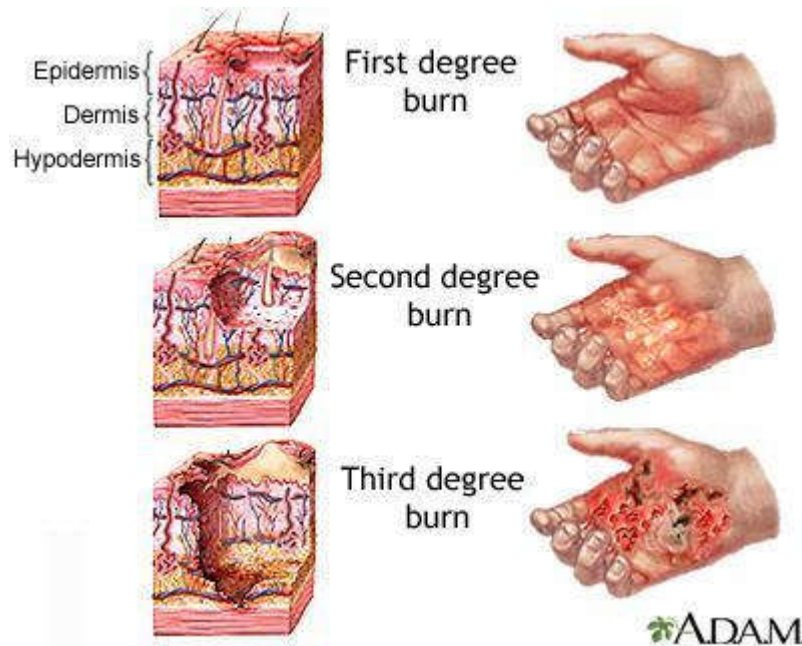
### **1. Patofisiologi Luka**

Etiologi luka dapat terjadi karena penyebab eksternal seperti mekanik (abrasi, operasi), fisika (panas/ api, dingin), zat kimia (zat korosif, asam, basa), dan radiasi (sinar UV) serta penyebab internal karena patofisiologi penyakit (luka diabetik, ulser kaki, komplikasi dengan infeksi).

Proses penyembuhan luka melalui proses yang kompleks dengan melibatkan beberapa fase yaitu hemostasis dan koagulasi, inflamasi, proliferasi dan maturasi. Selama fase inflamasi yang terjadi langsung setelah perlukaan, terbentuk penggumpalan darah. Sel seperti makrofag dan sel mast akan memproduksi sitokin pro-inflamasi yang menarik neutrofil ke luka. Sekitar 4 hari setelah trauma, debris dan bakteri akan disingkirkan oleh makrofag dan neutrophil kemudian angiogenesis dimulai dan fibroblast teraktivasi. Kemudian, fase proliferasi berlangsung sekitar 2 sampai 6 minggu. Beberapa faktor pertumbuhan menstimulasi fibroblas dan keratinosit. Angiogenesis membuat perkembangan granulasi jaringan dan epitelisasi. Setelah persembuhan luka, jaringan baru yang berupa serat kolagen akan terbentuk (Bijlard 2017).

Lama penyembuhan luka tergantung dari kedalaman dan keparahan luka serta jenis luka akut dan kronis. Pada metodologi kelas terapi penyembuh luka topikal ditujukan pada luka topikal yang diakibatkan oleh luka bakar derajat 2 (dua).

Luka bakar secara klasik, dibagi atas derajat 1 (satu), 2 (dua) dan 3 (tiga). Luka bakar derajat 1 hanya mengenai epidermis luar dan tampak sebagai daerah hiperemia dan eritema. Luka bakar derajat 2 mengenai lapisan epidermis yang lebih dalam dan sebagian dermis serta disertai lepuh dan/atau edema dan basah. Luka bakar derajat 3 mengenai semua lapisan epidermis dan dermis serta biasanya tampak sebagai luka kering, seringkali dengan vena koagulasi yang terbayang melalui permukaan kulit.



(Sumber: <https://medlineplus.gov/ency/imagepages/1078.htm>)

## 2. Metodologi Pengujian

### a. Prinsip Uji

Hewan uji diinduksi terjadinya luka bakar topikal sesuai metode yang berlaku. Hewan uji diberikan anestesi terlebih dahulu sebelum diinduksi mengalami luka bakar derajat 2 (dua) yang kemudian ditetapkan sebagai *baseline*. Selanjutnya diberikan sediaan uji selama waktu tertentu dan diamati perubahan parameter uji. Dilakukan evaluasi signifikansi perubahan parameter uji yaitu luas luka dan pengamatan histopatologi kulit sesudah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

### a. Metode Uji

#### 1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: kandang hewan individual, sonde oral, timbangan, alat gelas, termostat, alat pemanas listrik.
- b) Bahan: sediaan uji, pembawa dan obat pembanding.
- c) Hewan uji yang digunakan adalah kelinci dapat menggunakan galur New Zealand White sehat, berat minimal 2500 g dan tikus dapat menggunakan galur Sprague-Dawley sehat, berat minimal 250 g.

#### 2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok

dengan jumlah 5-8 ekor tiap kelompok. Hewan uji yang digunakan berjenis kelamin jantan, dikelompokkan sebagai berikut:

- a) Kontrol negatif (hewan uji luka bakar derajat 2 (dua)) diberi pakan standar dan diberi pembawa sediaan uji yang bersifat inert secara topikal serta dilakukan induksi luka bakar derajat 2 (dua).
- b) Kontrol positif (hewan uji luka bakar derajat 2 (dua)) diberi pakan standar dan dilakukan induksi luka bakar derajat 2 (dua). Kontrol positif diberi juga obat penyembuh luka bakar seperti silver sulfadiazine dan asam hialuronat dengan bentuk sediaan yang disesuaikan dengan sediaan uji.
- c) Kelompok perlakuan (hewan uji luka bakar derajat 2 (dua)) diberi pakan standar dilakukan induksi luka bakar derajat 2 (dua). Kelompok perlakuan diberi juga sediaan uji secara topikal minimal pada tiga kelompok dosis yang berbeda. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

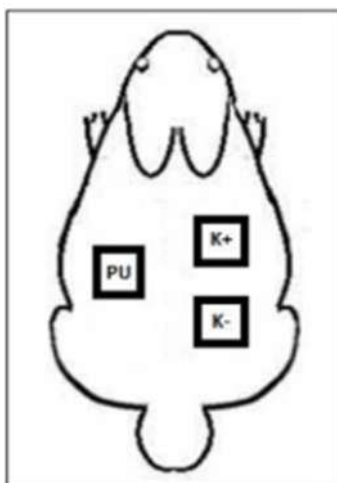
### 3) Induksi hewan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan induksi.

Induksi luka bakar derajat 2 (dua) pada hewan uji yang menunjukkan kerusakan pada epidermis dan dermis, kulit melepuh, merah dan lembab dapat dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- a) Bulu hewan uji dicukur pada sisi punggung dengan metode yang sesuai.
- b) Hewan uji dianestesi (tidak pada rencana area luka bakar) kemudian dibuat luka bakar dengan metode yang sesuai (misalnya dapat menggunakan alat pembuat luka bakar yang dirancang khusus dengan logam kuningan ukuran 1x1 cm yang dipanaskan dengan alat pemanas listrik yang dilengkapi dengan termostat untuk mengatur dan mempertahankan suhu yang telah ditentukan (misalnya 100°C selama 10 detik dengan beban tertentu)). Pembuatan luka bakar dilakukan minimal 12 jam setelah menghilangkan bulu.
- c) Perlakuan pada hewan uji dapat disatukan atau dipisah pada setiap hewan uji tergantung dari hewan uji dan jumlah kelompok perlakuan yang diperlukan.
- d) Posisi pemberian sediaan (kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok perlakuan) pada luka bakar dapat diacak setiap hewan dimana setiap sediaan akan diberikan pada posisi yang berbeda pada masing-masing hewan uji dalam satu kelompok atau pemberian sediaan diberikan pada hewan yang berbeda.





Gambar 1. Contoh letak perlakuan pada bagian dorsal kelinci di setiap kelompok perlakuan, produk uji (PU), kontrol positif (K+), kontrol negatif (K-)

Induksi dilakukan hingga terbentuk luka kemerahan dan melepuh sesuai luka bakar derajat 2 (dua) yang dilakukan secara konsisten untuk setiap hewan uji (direkomendasikan dilakukan oleh peneliti yang sama).

#### 4) Prosedur pemberian sediaan uji

Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti di atas. Pemberian sediaan dilakukan secara topikal sebanyak 100 mg 1 kali sehari selama 14 hari atau lebih sesuai dengan tujuan pemberian. Setelah pemberian produk uji setiap harinya, luka bakar ditutup dengan plester Hypafix kemudian ditutup lagi dengan leukoplast untuk mencegah jilatan dari kelinci. Pemberian sediaan uji dilakukan setiap hari dengan membuka plester, lalu luka dibilas dengan NaCl 0,9% dan dikeringkan dengan kasa steril. Kemudian sediaan uji diberikan kembali sesuai prosedur sebelumnya.

#### 5) Pengukuran parameter penyembuh luka bakar

Parameter penyembuh luka bakar yang diukur adalah pengukuran luas luka pada hari ke-1 (baseline), 4, 7, 10 dan 14 atau hari terakhir pemberian sediaan uji. Pengukuran luas luka dilakukan menggunakan Image J atau metode yang sesuai. Dilakukan pendokumentasian proses penyembuhan luka setiap hari dilengkapi dengan skala penggaris.

Minimal satu titik pada hari ke 14 atau hari terakhir pemberian sediaan uji dan jika diperlukan dapat dilakukan titik tambahan pada hari ke 7, sebanyak minimal 5 (lima) ekor hewan uji dari masing-masing kelompok dikorbankan. Selanjutnya dilakukan pengambilan jaringan kulit dari setiap margin pada luka untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi kulit dengan metode yang sesuai. Apabila

dilakukan pemeriksaan histopatologi kulit pada titik tambahan hari ke 7, maka jumlah hewan uji ditambahkan pada awal penelitian (minimal 5 (lima) ekor hewan uji).

#### 6) Evaluasi

Evaluasi dilakukan terhadap parameter yang telah ditentukan. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji yaitu pengukuran luas luka dan pemeriksaan histopatologi kulit sesudah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

#### **Daftar Pustaka**

- Danielle dos Santos Tavares Pereira. Development of Animal Model for Studying Deep Second-Degree Thermal Burns. Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2012.
- Elijah Zhengyang Cai. Creation of Consistent Burn Wounds: A Rat Model. Archives of Plastic Surgery, July 2014. Raluca L. Sobec. Improved Experimental Burn Model On Rabbits. Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iași – 2014 – vol. 118, no. 4
- Ayman Grada. Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing. Journal of Investigative Dermatology (2018) 138,2095e2105
- David C. Sabiston. Sabiston Buku Ajar Bedah (Essentials of Surgery) Bagian 1. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta :1995

## **C. MENINGKATKAN NAFSU MAKAN**

### **1. Patofisiologi Meningkatkan Nafsu Makan**

Penurunan nafsu makan merupakan suatu kondisi berkurangnya rasa lapar pada seseorang yang dapat disebabkan oleh berbagai penyebab seperti usia, kondisi penyakit akut, kondisi penyakit kronis atau berhubungan dengan proses pengobatan (M. Tiwaskar 2020). Penurunan nafsu makan dapat menyebabkan defisiensi nutrisi dan mengarah ke komplikasi yang berdampak negatif pada kesehatan, keadaan diri dan kualitas hidup (S. Banerjee dan A. Patel 2017). Kondisi ini dapat berlangsung secara singkat/ sementara atau panjang/waktu yang lama. Penurunan nafsu makan akut biasanya berlangsung sementara dan disebabkan oleh penyakit atau gangguan pencernaan sehingga terjadi penurunan berat badan dan nafsu makan secara tidak sengaja. Penurunan nafsu makan kronis biasanya terjadi dalam waktu yang lama berhubungan dengan kondisi komplikasi parah dan teramati pada pasien berusia lanjut serta pasien dengan kanker, gagal ginjal kronis, gangguan kecemasan (dementia, depresi), gangguan jantung dan gangguan hiperaktivitas (S. Nagaraj 2022).

Nafsu makan adalah keinginan untuk mendapatkan jenis makanan tertentu yang berguna untuk dimakan. Sensasi rasa lapar, selain karena keinginan makan juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan, budaya, dan pengaturan fisiologi di otak, terutama hipotalamus. (Guyton & Hall, 2007) Nukleus hipotalamus mempengaruhi sekresi beberapa hormon penting yang berasal dari kelenjar adrenal, tiroid serta sel-sel pulau pankreas (pulau Langerhans) dalam mengatur keseimbangan energi dan metabolisme. Hipotalamus menerima sinyal dari saluran pencernaan yang memberikan informasi sensorik mengenai isi lambung, diantaranya sinyal kimia dari zat nutrisi dalam darah (glukosa, asam amino, dan asam lemak), sinyal dari hormon gastrointestinal, sinyal dari jaringan lemak dan sinyal dari korteks serebri (penglihatan, penciuman dan pengecapan).

Sebagian besar energi yang disimpan dalam tubuh terdiri atas lemak dan jumlahnya dapat bervariasi pada berbagai individu. Penelitian menunjukkan bahwa hipotalamus merasakan adanya proses penyimpanan energi melalui kerja leptin (hormon peptide yang dilepaskan dari sel-sel lemak (adiposit) yang akan merangsang nafsu makan. Bila jumlah jaringan lemak meningkat, adiposit akan melepaskan leptin lebih banyak lagi ke dalam darah yang kemudian bersirkulasi ke otak dan menempati reseptor leptin di hipotalamus (nukleus arkuata dan paraventrikuler), sedangkan ghrelin dilepaskan terutama oleh sel oksintik lambung dan usus, yang dapat menurunkan nafsu makan. Kadarnya dalam darah meningkat selama puasa, sesaat sebelum makan dan menurun drastis setelah makan, yang mengisyaratkan hormon ini berperan untuk merangsang perilaku

makan (Guyton & Hall, 2007).

Pada metodologi pengujian yang digunakan dalam Pedoman ini ditujukan untuk meningkatkan nafsu makan yang tidak berhubungan dengan penyakit akut atau kronis tertentu.

## **2. Metodologi Pengujian**

### **a. Prinsip Uji**

Hewan uji dilakukan pemberian pakan dan minum standar sebelum dilakukan prosedur pemberian sediaan uji. Hewan uji direkomendasikan ditempatkan pada kandang metabolik. Selanjutnya diberikan sediaan uji selama waktu tertentu dan dilakukan pemeriksaan beberapa parameter yang dapat mengindikasikan peningkatan nafsu makan. Dilakukan evaluasi signifikansi perubahan parameter uji yaitu berat badan, konsumsi pakan dan tingkat nafsu makan insidentil sebelum dan sesudah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

### **a. Metode Uji**

#### **1) Alat, bahan dan hewan uji**

- a) Alat: kandang hewan individual, sonde oral, timbangan, alat gelas.
- b) Bahan: sediaan uji, pembawa dan obat pembanding.
- c) Hewan uji yang digunakan adalah tikus Sprague Dawley atau Wistar dan mecit.

#### **2) Pengelompokan hewan uji**

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor tiap kelompok. Hewan uji yang digunakan berjenis kelamin jantan, dikelompokkan sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol negatif diberikan pakan standar dan pembawa sediaan uji yang bersifat inert.
- b) Kontrol positif diberi pakan standar dan diberi obat peningkat nafsu makan misalnya siproheptadin (konversi dosis terapi manusia) yang dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- c) Kelompok perlakuan diberi pakan standar dan diberi sediaan uji minimal pada tiga kelompok dosis yang berbeda. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

#### **3) Induksi hewan uji**

Dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji

seperti di atas setelah aklimatisasi sehingga tidak ada perbedaan yang signifikan dalam rata-rata berat badan antar kelompok. Hewan uji tidak dilakukan induksi apapun. Dilakukan pemberian pakan dan minum standar selama selang waktu tertentu misalnya 10-14 hari atau lebih sebelum dilakukan prosedur pemberian sediaan uji untuk mengevaluasi konsumsi pakan sebelum perlakuan yang ditetapkan sebagai pengukuran baseline. Hewan uji direkomendasikan ditempatkan pada kandang metabolik.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Pemberian sediaan uji dilakukan pada hari ke-15 sampai hari ke-28 atau lebih sesuai dengan tujuan pemberian setelah dilakukan pengukuran baseline (misalnya pada 10-14 hari atau lebih).

5) Pengukuran parameter

Parameter meningkatkan nafsu makan yang diukur adalah sebagai berikut:

- a) Pengukuran berat badan yang dilakukan pada waktu yang sama setiap pagi hari setelah pengukuran sisa pakan. Direkomendasikan menggunakan kandang metabolik untuk mempertimbangkan jumlah feses dan urin.
- b) Konsumsi pakan harian.  
Dilakukan pada setiap hari sebelum pemberian dan setelah pemberian sediaan uji sampai akhir pengujian dengan cara sebagai berikut:
  - (1) Dilakukan pengukuran konsumsi pakan harian dengan cara menimbang pakan yang diberikan dan sisa pakan yang tersisa setiap pagi.
  - (2) Pemberian pakan dilakukan secara *ad libitum* dengan mempertimbangkan adanya sisa pakan setiap harinya.
- c) Pengumpulan data tingkat nafsu makan insidentil.  
Dilakukan pada setiap minggu selama 4 minggu atau lebih sebelum pemberian dan setelah pemberian sediaan uji sampai akhir pengujian pada tikus yang telah dipuaskan terlebih dahulu selama 12 jam selanjutnya dilakukan pengamatan sebagai berikut: (Direkomendasikan pengamatan dilakukan melalui perekaman dalam kamera).
  - (1) Dilakukan pengukuran waktu makan pertama, yaitu setiap pagi hari setelah diganti pakan berapa lama tikus mulai makan.
  - (2) Dilakukan pengukuran frekuensi makan, perhitungan dilakukan dalam 12 jam berapa kali tikus makan.
  - (3) Dilakukan pengukuran durasi makan untuk menghabiskan makanan yang disediakan.
- d) Jika diperlukan dapat dilakukan pengukuran index Lee serta pengukuran parameter hormon ghrelin dan leptin.

## 6) Evaluasi

Evaluasi dilakukan terhadap parameter yang telah ditentukan. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji yaitu berat badan, konsumsi pakan harian, tingkat nafsu makan insidental dan jika diperlukan evaluasi index Lee serta hormon ghrelin dan leptin sebelum dan sesudah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

### **Daftar Pustaka**

- M. Tiwaskar, "Perception, approach and management of loss of appetite: a cross-sectional, questionnaire based physician survey," *Journal of the Association of Physicians of India*, vol. 68, no. 2, pp. 55-60, 2020.
- S. Banerjee and A. Patel, "Prevalence of loss of appetite in patients visiting primary care physicians: a Crosssectional Survey," *Indian Journal of Medical Sciences*, vol. 69, no. 2, pp. 2-7, 2017.
- S. Nagaraj. 2022. "Loss of Appetite in Adult Patients: Effectiveness and Safety of an Appetite Stimulating Medication in an Open-Label, Investigator-Initiated Study in India" *Hindawi Journal of Nutrition and Metabolism*, vol 2022 pp. 1-7, 2022.
- Mohsen Nematy 2012 "The effect of hydroalcoholic extract of *Coriandrum sativum* on rat appetite" *Avicenna Journal of Phytomedicine*. Vol. 3, No. 1, Winter 2013, 91-97

## **D. GANGGUAN KECEMASAN**

### **1. Patofisiologi Gangguan Kecemasan**

Gangguan kecemasan didasari adanya gangguan beberapa neurotransmitter. Beberapa neurotransmitter tersebut seperti norepinefrin, serotonin, dopamin dan *gamma-aminobutyric acid* (GABA). Neurotransmitter dan peptida lainnya seperti *Corticotropin-Releasing Factor* (CRF) juga terlibat. Pada penderita kecemasan terjadi peningkatan aliran di daerah parahipokampus kanan dan mengurangi pengikatan reseptor serotonin 1A di korteks cingulate anterior, korteks cingulate posterior, dan nukleus raphe pasien, kemudian didapatkan peningkatan hipokretin yang berperan dalam patogenesis panik (Bhatt, 2019).

Sistem serotonin dan noradrenergik merupakan jalur yang umum terlibat dalam patofisiologi gangguan kecemasan. Aktivitas sistem serotonin yang rendah dan aktivitas sistem noradrenergik yang meningkat dipercaya terlibat dalam perkembangan gangguan kecemasan. Sistem noradrenergik mempunyai berbagai fungsi pada seluruh sistem saraf pusat dan perifer. Salah satu peran utamanya adalah memicu respon "*fight or flight*". Pada keadaan ansietas, norepinefrin dan epinefrin dilepaskan dan terikat pada seluruh reseptor tubuh yang dapat menghasilkan efek seperti pupil yang berdilasi, meningkatkan frekuensi detak jantung, dan sebagainya. Norepinefrin meningkatkan aktivitas amigdala, bagian otak yang mengatur perilaku yang berhubungan dengan rasa takut. Namun, apabila seseorang mengalami stress kronik, tingkat norepinefrin dapat jatuh di bawah tingkat normal karena perkembangan dari sistem respons stress setelah adanya eksposur stress yang berkepanjangan. Sehingga, *selective serotonin reuptake inhibitors* (SSRI) dan *serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors* (SNRI) merupakan tatalaksana lini pertama. (Munir & Takov, 2022).

Terdapat suatu susunan kompleks di antara neurotransmitter. Perubahan pada salah satu sistem neurotransmitter ikut mengubah sistem neurotransmitter lainnya, termasuk mekanisme *feedback*. Serotonin dan GABA adalah neurotransmitter penghambat yang menurunkan respon stress. Neurotransmitter-neurotransmitter tersebut adalah target penting dalam penatalaksanaan. (Adwas et al., 2019)

Amigdala merupakan bagian dengan peran penting dalam meredakan ketakutan dan kecemasan serta menyimpan ingatan emosional. Pasien yang terkonfirmasi mengalami gangguan kecemasan telah ditemukan menunjukkan respon amigdala yang meningkat terhadap tanda kecemasan. Struktur amigdala dan sistem limbik terhubung pada bagian korteks prefrontal dan kelainan aktivasi prefrontal-limbik dapat ditangani dengan intervensi psikologis atau farmakologis. (Chand & Marwaha, 2021).

Selain itu terdapat pula peran hormonal dalam patofisiologi stress. Stress dapat ditandai dengan berbagai perubahan fisiologis termasuk aktivasi aksis adrenal pituitari, yang dapat menjadi pelepasan steroid adrenal yang dipicu oleh pelepasan hormon adrenokortikotropik (ACTH) dari kelenjar pituitari. Stimulasi ACTH tersebut dikendalikan oleh *corticotropin releasing factor* (CRF) yang ada pada hipotalamus. Aktivasi berlebih tersebut dapat menghasilkan berbagai psikopatologi ansietas seperti Gangguan Cemas Menyeluruh, depresi dan bahkan merusak organ tubuh pada beberapa kasus kronis yang parah. Aktivasi aksis CRF dan sekresi ACTH tersebut, yang juga disebut sebagai aksis HPA, menghasilkan pelepasan glukokortikoid ke sistem sirkulasi. Glukokortikoid tersebut merupakan kunci utama dalam respon organisme terhadap stress, yang menghasilkan efek spesifik pada fungsi kognitif manusia dan model hewan uji, seperti hilangnya ingatan jangka pendek dan reversibel. (Kumar et al., 2013)

Banyak penelitian yang mengindikasikan bahwa predisposisi genetik berperan dalam perkembangan gangguan kecemasan. Namun, stressor lingkungan juga mempunyai peran. Seluruh jenis gangguan mental ikut dipengaruhi oleh faktor eksternal dan bagaimana pasien memproses dan bereaksi terhadap faktor eksternal tersebut. (Kaplan & Sadock, 1995)

Pada pedoman ini, metodologi pengujian kelas terapi gangguan kecemasan ditujukan pada *General Anxiety Disorder* (GAD).

Uji farmakodinamik gangguan kecemasan hanya dilakukan sebagai data dukung pelaksanaan uji klinik pada manusia.

## **2. Metodologi Pengujian**

### **a. Prinsip Uji**

Jika tersedia hewan uji standar maka digunakan hewan uji tersebut. Jika tidak tersedia, maka hewan uji diinduksi sehingga mengalami gangguan kecemasan berupa *stressor* sesuai metode yang berlaku. Hewan uji dipastikan mengalami gangguan kecemasan yang ditetapkan sebagai *baseline*. Selanjutnya diberikan sediaan uji selama waktu tertentu dan diamati perubahan perilaku melalui beberapa metode pengujian seperti: *Forced Swim Test* (FST), *Tail Suspension Test* (TST), *Open Field Test* (OFT), *Rotarod Test*, *Elevated Maze Test* dan metode lainnya yang sesuai parameter uji. Dilakukan evaluasi signifikansi perubahan parameter uji tersebut sebelum dan sesudah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

### **a. Metode Uji**

#### **1) Alat, bahan dan hewan uji**



- a) Alat: sonde oral, mikropipet, thermometer, rotarod, batang besi 60 cm, kotak ukuran 75 cm x 75 cm, stopwatch, lampu 40 W
- b) Bahan: sediaan uji, pembawa
- c) Hewan uji yang digunakan adalah mencit atau tikus.

## 2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor tiap kelompok. Hewan uji yang digunakan berjenis kelamin jantan, dikelompokkan sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar dan diberikan pembawa sediaan uji yang bersifat inert, kelompok ini tidak diberikan induksi stress.
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji diinduksi stress) diberi pakan standar dan diberikan induksi serta diberikan pembawa sediaan uji sampai akhir pengujian.
- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji diinduksi stress) diberi pakan standar diberikan induksi serta diberi obat standar dengan konversi dosis terapi manusia (misal golongan benzodiazepin). Obat standar tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- d) Kelompok perlakuan (hewan uji *diinduksi stress*) diberi pakan standar dan dilakukan induksi stress serta diberi sediaan uji minimal pada tiga kelompok dosis yang berbeda. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.

## 3) Induksi hewan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik.

Induksi gangguan kecemasan dapat dilakukan dengan cara induksi stress jangka pendek menggunakan Model CUMS (*Chronic unpredictable mild stress*).

Dilakukan pembentukan model CUMS (*Chronic unpredictable mild stress*) dengan pemberian sembilan jenis *stressor* (S) ringan yang berbeda dengan jumlah 2 *stressor* per hari selama dua minggu. *Stressor* 1 diberikan pada pukul 09:00 sedangkan *stressor* 2 diberikan pada pukul 13:00. Berikut beberapa contoh *stressor* sebagai berikut:

- mengurangi makanan;
- mengurangi minum;
- berenang di air yang dingin;
- mengganti teman satu kandang atau memperbanyak teman satu kandang;
- menjepit ekor;

- mengubah kandang seperti posisi kandang, membuat kandang dalam keadaan basah;
- hewan dimasukkan ke dalam restrainer atau
- stressor lain yang sesuai.

Adaptasi dilakukan dengan pemberian stressor secara acak selama 1 minggu terlebih dahulu dan dilanjutkan selama 2 minggu (14 hari) selama pengujian berlangsung. Pada hari ke-15 dilakukan uji perilaku *Open Field Test* terlebih dahulu dilanjutkan uji perilaku *Rotarod Test*, dan pemeriksaan kadar kortisol darah.

#### 4) Prosedur pemberian sediaan uji

Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. Sediaan uji diberikan secara per oral selama 28 hari atau lebih sesuai dengan tujuan pemberian. Pemberian senyawa induksi dan/atau prosedur induksi tetap dilakukan sampai selesai pengujian. Pemberian senyawa induksi diberikan dalam jadwal yang sama setiap harinya.

#### 5) Pengukuran parameter

Parameter gangguan kecemasan yang diukur umumnya minimal 3 (tiga) metode yaitu *Rotarod Test* (RT) dan 2 (dua) metode lain sebagai berikut: *Open Field Test* (OFT), *Elevated Plus Maze*, *Forced swim test*, (*FST*), *Irwin test* atau metode lain yang sesuai. Bila diperlukan dapat dilakukan pengujian kadar kortisol dengan metode yang sesuai.

Beberapa contoh metode dalam pengukuran parameter tersebut adalah sebagai berikut: (dapat menggunakan metode sesuai dengan literatur yang valid)

##### a) *Open Field Test* (OFT)

*Open Field Test* dilakukan dengan menggunakan kotak ukuran 75 cm x 75 cm (terbuka bagian atas), bagian dalam dibuat kotak-kotak kecil ukuran 15 cm x 15 cm atau menggunakan metode yang sesuai. Selama pengujian OFT, percobaan direkam dengan kamera digital untuk melakukan *assessment* terhadap perilaku mencit. Hewan uji diadaptasi terlebih dahulu selama 5 menit untuk eksplorasi lingkungan baru sehari sebelum pengujian. Pada saat pengujian, hewan uji dimasukkan ke dalam kotak selama 5 menit, dan jumlah garis yang dilewati oleh hewan uji saat eksplorasi kotak dihitung (*recorded*) menggunakan *software* atau metode yang sesuai (misal: *EthoVision* [versi 7.1], perangkat lunak pelacakan video untuk otomatisasi paradigma perilaku). Kondisi ansietas ditandai saat hewan uji lebih banyak diam dan lebih sedikit melewati garis yang ada di dalam kotak.

Parameter termasuk jarak total berpindah dalam cm (TDM), jumlah *grooming* dan *rearing* (sebagai ukuran aktivitas vertikal), dan waktu yang dihabiskan di pinggiran dan pusat dicatat untuk setiap tikus. Di akhir setiap tes, tikus dikeluarkan dari chamber dan lapangan dibersihkan dengan kain lembab. Kebermanfaatan gangguan kecemasan ditandai saat hewan uji lebih banyak melewati garis dengan keempat kaki.

b) Rotarod Test (RT)

Mencit dilatih terlebih dahulu menggunakan alat *rotarod* dengan kecepatan 15 rpm sehari sebelum pengujian. Pada saat hari pengujian, mencit diletakkan di alat *rotarod* dan pengamatan dilakukan dengan mengukur waktu kemampuan mencit bertahan di alat *rotarod* pada kecepatan 15 rpm hingga terjatuh. Semakin cepat mencit terjatuh dari alat rotarod menunjukkan mencit sudah mengalami kondisi ansietas.

Selain itu dapat digunakan rotarog dengan kecepatan dari 10 hingga 60 rpm. Terdapat tiga uji coba hingga 300 detik yang diikuti oleh 30 menit istirahat antar uji coba. Dicatat durasi masing-masing tikus mampu mempertahankan keseimbangannya dengan berjalan di atas tongkat yang bergerak.

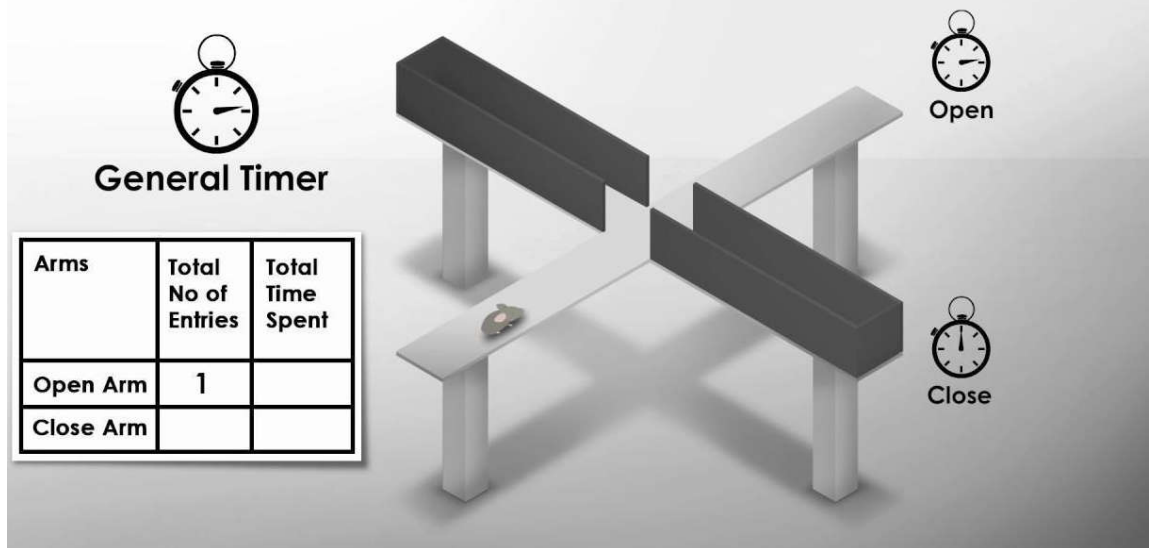
Kebermanfaatan untuk gangguan kecemasan ditunjukkan dengan hewan uji lebih banyak bergerak dan lebih banyak melewati garis yang ada di dalam kotak.

c) Elevated Maze (Misalnya Plus Maze, T- Maze, O- Maze dll).

*Elevated Plus Maze* terdiri dari peralatan kayu hitam dengan lengan yang memiliki dimensi yang sama. Dua lengannya tertutup oleh tembok (30 x 15 x 5 cm) dan disusun berjajar dengan 2 bukaan berlawanan lengan (30x 5cm). Labirin itu ditinggikan 50 cm di atas lantai. Tikus-tikus itu kemudian ditempatkan di tengah labirin, menghadap ke tempat lengan. Dua lampu 100 W menerangi arena. Tikus diizinkan untuk menjelajahi labirin, dan perilaku mereka adalah dipantau selama 10 menit menggunakan perangkat lunak EthoVision. Setelah setiap tes, alat dibersihkan dengan etanol 70% untuk menghilangkan sisa bau. Selanjutnya, waktu yang dihabiskan di tangan terbuka, jumlah entri ke lengan terbuka, dan jumlah total entri ke lengan dicatat



## Maze Basics: **Elevated Plus Maze**



Gambar. Elevated Plus Maze

### 6) Evaluasi

Evaluasi dilakukan terhadap parameter yang telah ditentukan terhadap minimal (3) tiga metode. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji yaitu parameter uji perilaku dan bila diperlukan dilakukan pemeriksaan kadar kortisol dan serotonin sesudah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi klinik sebagai pertimbangan utama selain signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

### **Daftar Pustaka**

- Masoumi-Ardakani, Y., Mahmoudvand, H., Mirzaei, A., Esmaeilpour, K., Ghazvini, H., Khalifeh, S., & Sepehri, G. (2017). The effect of *Elettaria cardamomum* extract on anxiety-like behavior in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 87, 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.116>
- Kumar, A. et al., (2013). Stress: Neurobiology, consequences and management. *J Pharm Bioallied Sci.* Apr-Jun; 5(2): 91–97. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3697199/>.
- Munir, S. dan Takov, V., (2022). Generalized Anxiety Disorder. *National Library of Medicine: National Center of Biotechnology Information.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441870/>

- Sadock BJ, Sadock VA. Gangguan Ansietas. Muttaqin H, Sihombing RN, editor. Kaplan & Sadock Buku Ajar Psikiatri Klinis, Edisi 2. Jakarta:Penerbit Buku Kedokteran, 2014:230-287.
- Chand SP, Marwaha R, Bender RM. Anxiety (Nursing). In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2021. PMID: 33760520.
- Adwas, AA. et al., (2019). Anxiety: Insights into Signs, Symptoms, Etiology, Pathophysiology, and Treatment. *East African Scholars J Med Sci, Volume-2. Issue-10*, 580-591.
- Bhatt, NV., (2019). Anxiety Disorders. Medscape. <https://emedicine.medscape.com/article/286227-overview?form=fpf>

## **E. KOMPLEMENTER KANKER PAYUDARA**

### **1. Patofisiologi Kanker Payudara**

Kanker atau karsinoma diawali dari adanya pertumbuhan adenoma yang tidak terkendali. Beberapa perubahan molekuler yang menyebabkan terjadinya pertumbuhan kanker yaitu mutasi lokus APC di kromosom 5q, hilangnya metilasi DNA, mutasi gen RAS di kromosom 12p, hilangnya gen penekan tumor di kromosom 18q lalu kemudian hilangnya p53 di kromosom 17p. Sifat-sifat utama dari sel kanker yaitu menghindari apoptosis, menghasilkan sinyal pertumbuhan, insensitivitas terhadap sinyal anti-pertumbuhan, menginvasi jaringan dan metastasis, memiliki kemampuan replikasi tanpa-batas dan angiogenesis yang berkelanjutan. Pada sel normal yang mengalami kerusakan atau mutasi DNA, akan mengalami 2 proses yaitu perbaikan DNA sehingga sel kembali normal atau proses apoptosis yang menimbulkan kematian sel tersebut. Pada sel kanker, terdapat mutasi pada genom sel somatik yang berdampak pada pengaktifan onkogen pendorong pertumbuhan, perubahan gen yang mengendalikan pertumbuhan serta menonaktifkan gen supresor kanker, sehingga terjadi ekspresi produk gen yang mengalami perubahan dan hilangnya produk gen regulatorik yang akhirnya dapat menimbulkan keganasan (kanker).

Kanker payudara merupakan kanker yang paling umum terdiagnosis pada wanita (1:10). Kanker payudara diawali dengan adanya kerusakan DNA dan mutasi genetik yang dipengaruhi oleh paparan estrogen. Selain itu, cacat DNA ini diwarisi melalui perubahan pada gen prokanker seperti BRCA1 dan BRCA2. BRCA1 dan BRCA2 merupakan sel tumor suppressor yang mengalami mutasi sehingga terjadi disfungsi yang dapat menyebabkan penurunan hambatan perkembangan sel dan terjadi pertumbuhan kanker payudara. riwayat keluarga dengan kanker ovarium atau payudara akan meningkatkan risiko perkembangan kanker payudara. Pada individu normal, sistem imun akan menyerang sel dengan DNA abnormal. Keadaan ini tidak terjadi pada sel kanker payudara yang selalu tumbuh dan menyebar (Macdonald et al., 2016).

Faktor genetik berperan sebagai pemicu awal kanker payudara, namun jenis kanker yang berbeda ditentukan oleh faktor risiko yang berbeda pula. Gen yang meregulasi pertumbuhan sel adalah proto-onkogen yang mendorong pertumbuhan sel normal, tumor suppressor gene yang menghambat pertumbuhan proto-onkogen menjadi onkogen, dan gen apoptosis yang memicu proses bunuh diri pada sel dengan DNA yang rusak. Onkogen merupakan gen mutan dari proto-onkogen yang menyebabkan transformasi sel. Ada beberapa mutasi gen yang menyebabkan kanker yaitu mutasi pada tumor suppressor genes yang jika terjadi inaktivasi dapat

menjadi gen prokanker BRCA, aktivasi pada onkogen, mutasi pada proto-onkogen yang dapat menjadi onkogen, inaktivasi pada DNA repair genes, peningkatan pada telomerase yang dapat memperpanjang telomer, inaktivasi pada p53 yang dapat menyebabkan gagalnya aktivasi caspase pada gen apoptosis. Secara umum, perubahan pada gen-gen tersebut bersifat sporadik.

Beberapa faktor risiko seperti merokok, minum alkohol dan pola diet merupakan faktor yang dapat diubah. Beberapa faktor lainnya merupakan faktor yang tidak dapat diubah seperti usia, ras, ataupun riwayat keluarga. (Gouri & Parmar, 2013).

Hormon diperkirakan mempunyai peran yang penting dalam pertumbuhan sel kanker payudara. Ada beberapa jenis kanker payudara seperti kanker payudara *triple-negative breast cancers* (TNBC) dan non-TNBC. Kanker payudara TNBC adalah jenis kanker payudara yang dapat lebih mudah menyebar dari kanker payudara non-TNBC serta bersifat lebih agresif. Kanker payudara TNBC lebih mungkin mengalami metastasis dan kembali setelah selesai tatalaksana. Kanker payudara TNBC adalah subtype heterogen kanker payudara yang dikarakterisasi dengan kurangnya reseptor estrogen (ER), reseptor progesteron (PR) dan *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2).

Jenis kanker payudara tersebut juga berhubungan dengan jenis kanker payudara *hormone dependent* dan *non hormone dependent*. Kanker payudara yang bersifat *hormone dependent* mempunyai sel kanker yang mengandung protein dengan reseptor hormon, yaitu reseptor estrogen (ER) dan reseptor progesteron (PR) yang dapat teraktivasi ketika ada hormon yang terikat dengan protein tersebut. Reseptor yang teraktivasi menyebabkan perubahan ekspresi gen spesifik, yang dapat menstimulasi pertumbuhan sel. Untuk menentukan apakah sel kanker payudara mengandung reseptor hormon, dokter akan menguji sampel jaringan payudara yang diambil melalui proses bedah. Jika sel kanker mengandung reseptor estrogen, maka kanker disebut positif reseptor estrogen (*ER positive*). Jika sel kanker mengandung reseptor progesteron, maka kanker disebut positif reseptor progesteron (*PR atau PgR positive*). Kanker payudara yang mengandung reseptor estrogen dan/atau progesteron terkadang disebut sebagai positif reseptor hormon (*HR positive*). Sebaliknya, jika tidak mempunyai reseptor estrogen (ER) maka disebut *ER negative* dan jika tidak mempunyai ER dan reseptor progesteron (PR) maka disebut *HR negative*.

Pada pedoman ini, penelitian obat bahan alam ditujukan sebagai komplementer pada pengobatan kanker payudara. Pengobatan komplementer adalah tatalaksana yang bersifat suportif bersamaan dengan tatalaksana medis standar untuk membantu meningkatkan efikasi tatalaksana, mengurangi toksisitas dari tatalaksana dan mengurangi efek samping

tatalaksana kanker antara lain kelelahan, kerontokan pada rambut, infeksi, memar, pendarahan, nyeri pada mulut, hilang nafsu makan, gangguan pada kulit dan kuku, gangguan ingatan, gangguan tidur, diare, konstipasi, dan lain lain. Penggunaan komplementer kanker payudara dapat meningkatkan kesejahteraan dan kualitas hidup.

Pada uji farmakodinamik kelas terapi komplementer payudara direkomendasikan melakukan uji in vitro terlebih dahulu sebagai data dukung untuk melakukan uji.

Uji farmakodinamik komplementer kanker payudara dilakukan hanya sebagai data dukung pelaksanaan uji klinik pada manusia.

## 2. Metodologi Pengujian

### a. Prinsip Uji

Pada uji farmakodinamik kelas terapi komplementer payudara direkomendasikan melakukan uji in vitro terlebih dahulu sebagai data dukung untuk melakukan uji.

Jika tersedia hewan uji standar model kanker transgenik GEMMs (*genetic engineered animal models*) maka digunakan hewan uji tersebut. Bila tidak tersedia, maka hewan uji dibuat memiliki kanker payudara melalui metode yang sesuai. Hewan uji yang sudah mengalami kanker payudara (diamati berdasarkan adanya perkembangan tumor) ditetapkan sebagai baseline. Selanjutnya hewan uji diberi sediaan uji sampai waktu yang ditentukan. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perkembangan tumor pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

### b. Metode Uji

#### 1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: kandang hewan, peralatan *handling* sitostatika (misalnya BSL2),
- b) Bahan: sediaan uji, pembawa, obat pembanding standar
- c) Hewan uji yang digunakan adalah mencit atau tikus.

#### 2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor tiap kelompok. Apabila memungkinkan, dapat diimplementasikan replikasi percobaan di mana satu hewan uji dapat diimplan beberapa lokasi replikasi (misal 3 titik pada 1 hewan). Hewan uji yang digunakan berjenis kelamin betina, dikelompokkan sebagai berikut:



- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar dan diberikan pembawa sediaan uji yang bersifat inert, kelompok ini tidak diberikan induksi kanker payudara.
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji diinduksi kanker payudara) diberi pakan standar dan diberikan induksi kanker payudara serta diberikan pembawa sediaan uji sampai akhir pengujian.
- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji diinduksi kanker payudara) diberi pakan standar diberikan induksi kanker payudara serta diberi obat standar dengan konversi dosis terapi manusia (misalnya Doxorubicin). Obat standar tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji. Secara umum digunakan kombinasi siklofosfamid, doxorubicin dan 5-fluorourasil.
- d) Kelompok komplementer (hewan uji diinduksi kanker payudara) diberi pakan standar diberikan induksi kanker payudara serta diberi obat standar/ tatalaksana standar dengan konversi dosis terapi manusia (misalnya kombinasi siklofosfamid, doxorubicin dan 5-fluorourasil) dan ditambah sediaan uji minimal pada tiga kelompok dosis yang berbeda. Obat standar tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah.
- e) Kelompok perlakuan (hewan uji diinduksi kanker payudara) diberi pakan standar dan dilakukan induksi kanker payudara serta diberi sediaan uji minimal pada tiga kelompok dosis yang berbeda. Dalam hal tidak menggunakan tiga kelompok dosis maka penentuan kelompok dosis harus berdasarkan justifikasi ilmiah. Kelompok perlakuan ini tidak wajib, namun direkomendasikan.

### 3) Induksi hewan uji

Uji pendahuluan harus dilakukan untuk memastikan keberhasilan dan kestabilan induksi yang dibuktikan secara statistik dan klinik. Induksi dilakukan sampai didapatkan tumor yang stabil ditunjukkan dengan ukuran tumor yang diharapkan sesuai dengan hasil uji pendahuluan.

Induksi kanker payudara dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a) Metode Transplantasi
 

Penggunaan metode transplantasi lebih direkomendasikan karena memiliki keberhasilan dan spesifisitas yang baik untuk induksi kanker payudara.

  - (1) Menggunakan Mencit strain rentan
    - (a) Menggunakan *nude mice (immunodeficiency)*

Menggunakan *nude mice*. Bisa menggunakan sel kanker payudara manusia T47D atau lini sel lainnya.

(b) Menggunakan C3H

Strain C<sub>3</sub>H dianggap sebagai strain yang sangat rentan untuk kanker kelenjar payudara (Strong, n.d.). Strain lain yang dianggap rentan adalah DBA (insidensi mencit C<sub>3</sub>H dan DBA adalah > 70%). Strain lain seperti BALB/c dan C57BL memiliki insidensi rendah, meskipun sudah merupakan hasil *breeding* (<5%) (Medina, 2010).

Hewan uji diinokulasi dengan bubur tumor terutama berasal dari mencit C<sub>3</sub>H yang digunakan sebagai donor tumor. Inokulasi dilakukan secara subkutan sebanyak 0,2 ml bubur tumor/ekor di aksila kanan atau sesuai uji pendahuluan. Tumor tumbuh berkisar antara 5 – 7 hari (masa laten). Perlakuan diberikan secara oral dengan sonde lambung sebanyak 0,2 ml setiap hari mulai mencit diinokulasi dengan bubur tumor sampai akhir penelitian misalnya 4 minggu atau lebih atau sesuai uji pendahuluan.

(2) Menggunakan model implan sel kanker

Sel kanker dapat ditransplantasi ke strain genetik yang sama dengan mencit yang memiliki fungsi imun normal. Umumnya sel kanker yang digunakan lini sel 4T1 atau sel kanker lain yang sesuai (Zeng et al., 2020).

Tumor diimplantasikan pada mencit dengan injeksi subkutan misalnya menggunakan lini sel 4T1 (dosis 1 x 10<sup>6</sup> sel/hewan (lokasi)) atau sesuai uji pendahuluan pada bantalan lemak payudara (Majumder et al., 2019). Tumor tumbuh berkisar antara 8 – 17 hari (masa laten). (Zeng et al., 2020)

b) Metode dengan Induksi Senyawa Kimia

Terdapat beberapa pilihan senyawa induksi kimia yang dapat digunakan misalnya 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA) dosis 20 mg/kg BB secara intragastric atau sesuai uji pendahuluan. Senyawa induksi lain misalnya N-methyl-N-nitrosourea (NMU); 3,4-benzopyrene; 3-methylcholanthrene (MCA); 2,5,6 dibenzanthracene; Urethane dan lain – lain dapat digunakan dengan dosis dan rute pemberian sesuai uji pendahuluan. (Zeng et al., 2020)

Pada metode induksi ini, penggunaan pembanding kontrol positif ditentukan setelah melakukan pengujian HER2, PR dan ER.

c) Metode Radiasi

Menggunakan radiasi neutron atau X-rays termasuk sinar Gamma pada seluruh badan atau segmental pada tikus dengan metode yang sesuai. Strain di tikus yang paling peka terhadap metode ini adalah strain Sprague-Dawley dan Lewis. Tumor payudara dari iradiasi umumnya *hormone-dependant adenocarcinomas* atau *fibroadenomas*. (Zeng et al., 2020) Dalam penggunaan metode radiasi perlu dilakukan uji pendahuluan untuk penentuan dosis, lama pemaparan (durasi), jarak radiasi, penentuan target organ dan waktu radiasi yang dapat memberikan keberhasilan induksi yang stabil. Pada pelaksanaan metode radiasi, direkomendasikan untuk menggunakan anestesi dan perlindungan terhadap organ lain (misalnya menggunakan kertas timbal).

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Setelah induksi berhasil, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan hewan uji seperti diatas. Hewan diberikan sediaan uji dimulai misalnya setelah 10 hari tumor berkembang dan dilakukan hingga 22 hari (misalnya pemberian 4 dosis, dengan interval 72 jam) atau sesuai uji pendahuluan.

5) Pengukuran parameter

Parameter komplementer kanker payudara yang diukur adalah:

a) Berat Badan

Dilakukan pengukuran parameter berat badan mulai dari hari ke 0 sampai dengan akhir penelitian.

Berat badan relatif (*Relative body weights/RBW*) dari masing-masing hewan uji dihitung dengan membagi berat badan absolut individu pada hari X ( $BW_x$ ) oleh berat badan individu pada hari ke- 0 ( $BW_0$ ), dikalikan dengan 100, seperti yang ditunjukkan oleh persamaan berikut:

$$RBW_x [\%] = (BW_x [g] / BW_0 [g]) \times 100$$

Median atau mean +/- SEM dari berat badan relatif dihitung, mengingat hanya berat badan mencit yang hidup pada hari yang bersangkutan yang digunakan untuk perhitungan median RBW.

b) Volume Tumor dan Jumlah Tumor

Pengukuran tumor dilakukan setelah melewati masa laten (misalnya 5 – 7 hari setelah inokulasi). Nodul tumor dapat diukur panjang dan lebar dengan menggunakan jangka sorong untuk mendapatkan volume tumor, volume tumor relatif (RTV) dan pertumbuhan tumor relatif (T/C%). Volume tumor dihitung dengan menggunakan rumus:

$$P \times L^2 \times 0,52$$

(P dimana panjang merupakan tumor terbesar diameternya dan L adalah lebar mewakili perpenduikular diameter tumor).

c) Jumlah Tumor

Dilakukan pengukuran jumlah tumor yang terbentuk.

d) Histopatologi

Pada akhir penelitian semua hewan uji dieuthanasia dengan cara dislokasi servikal, setelah itu hewan uji dinekrosipi untuk mengambil nodul tumor, selanjutnya nodul tumor difiksasi dengan buffer formalin 10% untuk dilakukan histopatologi. Pengamatan histopatologi dapat menggunakan pewarnaan Haematoksilin Eosin untuk mengamati area nekrosis atau metode lain yang sesuai.

e) Hematologi dan biokimia darah

Dilakukan pengujian hematologi dengan metode yang sesuai terhadap parameter yang sesuai.

(Hematologi rutin (hematokrit, hemoglobin, trombosit, leukosit, eritrosit) dan biokimia darah ginjal (ureum dan kreatinin) dan hati (SGPT dan SGOT).

f) Apabila terdapat tujuan penelitian spesifik lain maka perlu ditambahkan parameter sesuai dengan tujuan tersebut misalnya penanda imunohistokimia, mutasi gen, pengaruh pada sistem imun, angiogenesis dan parameter lainnya. Selain itu, untuk pengajuan klaim misalnya untuk mengurangi efek samping tertentu akibat pengobatan standar, maka perlu ditambahkan parameter sesuai dengan klaim tersebut.

6) Evaluasi

Evaluasi dilakukan terhadap parameter yang telah ditentukan. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji yaitu parameter berat badan dan pertumbuhan tumor sesudah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan perubahan parameter uji pada kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi klinik sebagai pertimbangan utama selain signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

## Daftar Pustaka

- Clarke, R. (2009). The role of preclinical animal models in breast cancer drug development. *Breast Cancer Research*, 11(SUPPL. 3), 11–13. <https://doi.org/10.1186/bcr2441>
- Macdonald, S., Oncology, R., & General, M. (2016). Breast Cancer. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 70(8), 515–517. <https://www2.tri-kobe.org/nccn/guideline/breast/english/breast.pdf>
- Majumder, M., Debnath, S., Gajbhiye, R. L., Saikia, R., Gogoi, B., Samanta, S. K., Das, D. K., Biswas, K., Jaisankar, P., & Mukhopadhyay, R. (2019). Ricinus communis L. fruit extract inhibits migration/invasion, induces apoptosis in breast cancer cells and arrests tumor progression in vivo. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50769-x>
- Medina, D. (2010). Of Mice and Woman: A Short History of Mouse Mammary Cancer Research with an Emphasis on the Paradigms Inspired by the Transplantation Method. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, 1–12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004523>
- Strong, L. C. (n.d.). The Establishment Of the C3H Inbred Strain of Mice for the Study of Spontaneous Carcinoma of the Mammary Gland 1.
- Zeng, L., Li, W., & Chen, C. (2020). Breast cancer animal models and applications. *Zoological Research*, 41(5), 477–494. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.095>