

Masukan dapat kami terima paling lambat tanggal 28 Oktober 2022 melalui email ditstandarotskkos@pom.go.id cc: standar_ot@pom.go.id dengan mengunduh format masukan pada <https://bit.ly/FormMasukanFarmakodinamikLanjutan>

RANCANGAN
PERATURAN BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
NOMOR TAHUN 2022
TENTANG
PEDOMAN UJI FARMAKODINAMIK PRAKLINIK OBAT TRADISIONAL

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

- Menimbang : a. bahwa uji farmakodinamik praklinik obat tradisional merupakan metode yang diterapkan untuk pengembangan obat tradisional melalui pembuktian khasiat secara ilmiah sebelum beredar untuk memenuhi persyaratan keamanan, khasiat, dan mutu dengan tujuan meningkatkan daya saing serta mempercepat pengembangan industri farmasi khususnya industri obat tradisional, perlu diatur mengenai uji farmakodinamik praklinik obat tradisional;
- b. bahwa berdasarkan ketentuan Pasal 6 ayat (1) huruf d Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 007 Tahun 2012 tentang Registrasi Obat Tradisional, Badan Pengawas Obat dan Makanan berwenang mengatur kriteria obat tradisional yang berkhasiat yang dibuktikan secara ilmiah sehingga dapat diberikan izin edar;
- c. bahwa beberapa ketentuan mengenai Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional sebagaimana telah diatur dalam Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 18 Tahun 2021 tentang Pedoman Uji

Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional, perlu disesuaikan dengan kebutuhan hukum serta perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi dibidang Obat Tradisional sehingga perlu diganti;

- d bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a, huruf b, dan huruf c, perlu menetapkan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan tentang Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional.

- Mengingat :
1. Peraturan Presiden Nomor 80 Tahun 2017 tentang Badan Pengawas Obat dan Makanan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2017 Nomor 180);
 2. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 7 Tahun 2012 tentang Registrasi Obat Tradisional (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 226);
 3. Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 21 Tahun 2020 tentang Organisasi dan Tata Kerja Badan Pengawas Obat dan Makanan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2020 Nomor 1002) sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 13 Tahun 2022 tentang perubahan atas PerBPOM No 21 Tahun 2020 tentang Organisasi dan Tata Kerja Badan Pengawas Obat dan Makanan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2022 Nomor 629)

MEMUTUSKAN:

Menetapkan : PERATURAN BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN TENTANG PEDOMAN UJI FARMAKODINAMIK PRAKLINIK OBAT TRADISIONAL.

Pasal I

Dalam Peraturan Badan ini yang dimaksud dengan:

1. Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional adalah bagian dari pembuktian khasiat secara ilmiah melalui uji untuk mempelajari efek obat tradisional terhadap fungsi berbagai organ tubuh pada hewan uji yang dilakukan untuk bahan baku dan/atau produk jadi.

2. Obat Tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan, dan dapat diterapkan sesuai dengan norma yang berlaku di masyarakat.
3. Pendaftar adalah industri Obat Tradisional, usaha kecil Obat Tradisional, usaha mikro Obat Tradisional, importir di bidang Obat Tradisional yang telah mendapat izin usaha sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan atau lembaga penelitian/riset yang mengajukan permohonan persetujuan pelaksanaan Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional.
4. Evaluator adalah pegawai di lingkungan Badan Pengawas Obat dan Makanan yang berdasarkan surat penunjukan dan surat tugas dari pejabat yang berwenang bertugas untuk melakukan evaluasi dan/atau penilaian terhadap permohonan evaluasi protokol dan/atau data Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional yang diajukan oleh Pendaftar.
5. Lembaga Penelitian/Riset adalah lembaga yang berbentuk badan hukum atau bukan badan hukum yang didirikan dan berkedudukan dalam wilayah hukum Negara Kesatuan Republik Indonesia yang melakukan kegiatan penelitian, pengembangan, pengkajian, penerapan, dan inovasi serta inovasi yang terintegrasi di bidang Obat Tradisional.

Pasal 2

- (1) Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional sebagai acuan bagi:
 - a. Evaluator dalam melaksanakan evaluasi terhadap khasiat Obat Tradisional berdasarkan pembuktian ilmiah protokol dan/atau data Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional; atau
 - b. Pendaftar dalam melaksanakan:
 1. Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional termasuk penyiapan data farmakodinamik

praklinik untuk mendukung aspek khasiat Obat Tradisional dalam rangka registrasi Obat Tradisional; dan

2. penelitian/riset serta pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang Obat Tradisional.

- (2) Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional sebagaimana dimaksud pada ayat (1) meliputi:
 - a. pedoman umum; dan
 - b. Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional berdasarkan kelas terapi.
- (3) Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional sebagaimana dimaksud pada ayat (2) tercantum dalam Lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan Badan ini.

Pasal 3

Pendaftar sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) huruf b dapat menggunakan metodologi lain berdasarkan referensi ilmiah yang sahih dan/atau metode yang tervalidasi setelah mendapat persetujuan dari Badan Pengawas Obat dan Makanan.

Pasal 4

Pada saat Peraturan Badan ini mulai berlaku Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 18 Tahun 2021 tentang Pedoman Uji Farmakodinamik Praklinik Obat Tradisional (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2021 Nomor 788), dicabut dan dinyatakan tidak berlaku.

Pasal 5

Peraturan Badan ini mulai berlaku pada tanggal diundangkan.

Agar setiap orang mengetahuinya, memerintahkan pengundangan Peraturan Badan ini dengan penempatannya dalam Berita Negara Republik Indonesia.

Ditetapkan di Jakarta
pada tanggal

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

PENNY K. LUKITO

Diundangkan di Jakarta
pada tanggal

MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
REPUBLIK INDONESIA,

YASONNA H. LAOLY.

BERITA NEGARA REPUBLIK INDONESIA TAHUN 2022 NOMOR

RANCANGAN

BAB III

UJI FARMAKODINAMIK PRAKLINIK OBAT TRADISIONAL BERDASARKAN KELAS TERAPI

- A. ANTIHIPERTENSI (Sesuai Peraturan Badan POM Nomor 18 Tahun 2021)**
- B. ANTIDISLIPIDEMIA (Sesuai Peraturan Badan POM Nomor 18 Tahun 2021)**
- C. ANTI OBESITAS (Sesuai Peraturan Badan POM Nomor 18 Tahun 2021)**
- D. ANTIHIPERURISEMIA (Sesuai Peraturan Badan POM Nomor 18 Tahun 2021)**
- E. ANTIHIPERGLIKEMIA (Sesuai Peraturan Badan POM Nomor 18 Tahun 2021)**
- F. ANTIDIARE NONSPESIFIK (Sesuai Peraturan Badan POM Nomor 18 Tahun 2021)**
- G. ANTIINFLAMASI (Sesuai Peraturan Badan POM Nomor 18 Tahun 2021)**
- H. PEREDA BATUK (Sesuai Peraturan Badan POM Nomor 18 Tahun 2021)**
- I. PEREDA NYERI (Sesuai Peraturan Badan POM Nomor 18 Tahun 2021)**
- J. PEREDA DEMAM (Sesuai Peraturan Badan POM Nomor 18 Tahun 2021)**

K. IMUNOSTIMULAN

1. Patofisiologi Imunostimulan

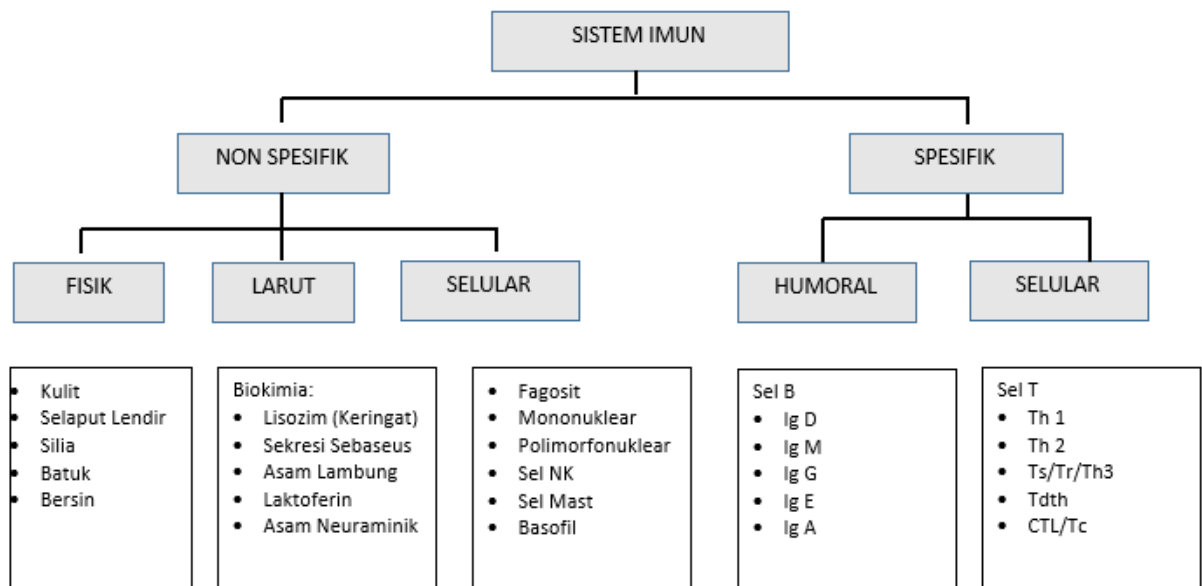
Sistem kekebalan adalah kompleks yang terintegrasi dari sel, jaringan, organ, dan mediator terlarut yang terlibat dalam mempertahankan organisme terhadap bahan asing (xenobiotika) yang mengancam integritas organisme. Salah satu fitur utama dari sistem kekebalan adalah kemampuannya untuk membedakan antara diri sendiri (sel dan jaringan sendiri) dan bahan asing (molekul asing dan mikroba lingkungan).

Keutuhan tubuh dipertahankan oleh sistem pertahanan yang terdiri atas sistem imun nonspesifik (*natural/innate*) dan spesifik (*adaptive/acquired*). Sistem imun nonspesifik seperti inflamasi, interferon, sel natural killer dan sistem komplemen merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme. Sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda asing dan memerlukan waktu sebelum memberikan responnya. Bila sistem tersebut terpajan ulang dengan benda asing yang sama, maka akan segera dikenali dan dihancurkan.

Sistem imun nonspesifik dapat bekerja melalui mekanisme fisika, media terlarut, dan seluler. Salah satu mekanisme sistem imun nonspesifik seluler adalah fagositosis. Meskipun berbagai sel dalam tubuh dapat melakukan fagositosis, sel utama yang berperan pada pertahanan nonspesifik adalah sel

mononuklear (monosit dan makrofag) serta sel polimorfonuklear seperti neutrofil. Fagositosis dini yang efektif pada invasi kuman, akan dapat mencegah timbulnya penyakit. Proses fagositosis terjadi dalam beberapa tingkat sebagai berikut: kemotaksis, menangkap, membunuh dan mencerna.

Sistem imun spesifik terdiri atas humoral dan seluler. Respon imun spesifik humoral ditandai dengan pelepasan berbagai produksi imunoglobulin oleh sel limfosit B. Antibodi atau imunoglobulin (Ig) adalah golongan protein yang dibentuk sel plasma (proliferasi sel B) setelah terjadi kontak dengan antigen. Antibodi ditemukan dalam serum dan jaringan dan mengikat antigen secara spesifik. IgG merupakan komponen utama (terbanyak) imunoglobulin serum. IgG dapat mengaktifkan komplemen, meningkatkan pertahanan badan melalui opsonisasi dan reaksi inflamasi. IgM (M berasal dari makroglobulin) merupakan Ig terbesar. IgM dapat mencegah gerakan mikroorganisme patogen, memudahkan fagositosis dan merupakan aglutinator kuat terhadap butir antigen, juga merupakan antibodi yang dapat mengikat komplemen dengan kuat dan tidak menembus plasenta. Gambaran komponen-komponen sistem imun dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Komponen-komponen sistem imun

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Bahan-bahan yang bersifat imunostimulan dapat dimanfaatkan untuk memelihara, meningkatkan dan mengembalikan fungsi kekebalan tubuh.

Imunostimulan adalah segala hal yang dapat meningkatkan jumlah sel-sel imun serta meningkatkan fungsi sel-sel imun.

Untuk tujuan pengujian imunostimulan yang dapat memelihara atau meningkatkan fungsi kekebalan dapat menggunakan hewan uji normal yang tidak mengalami defisiensi imunitas namun diberikan senyawa tertentu untuk *challenge test* seperti pemberian vaksin atau bakteri tertentu. Selanjutnya hewan uji diberi sediaan uji sampai waktu yang ditentukan. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan perbedaan indeks stimulasi melalui pengujian fagositosis, parameter hematologi dan pengujian ekspresi sitokin untuk metode imunostimulan nonspesifik dan ditambahkan pengujian titer antibodi untuk metode imunostimulan spesifik 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, spuit injeksi, sonde oral, peralatan gelas, mikropipet, tabung mikrosentrifus, timbangan, sentrifus dan spektrofotometer UV-Visible, microplate reader.
- b) Bahan: sediaan uji, pembanding, bahan kimia/ biologi penginduksi.
- c) Hewan uji: tikus atau mencit.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor per kelompok. Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar dan diberikan pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi respon imun.
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji yang dilakukan *challenge test*) diberi pakan standar dan dilakukan *challenge test*.
- c) Kelompok pembanding, jika diperlukan (hewan uji yang dilakukan *challenge test*) diberi pakan standar dan dilakukan *challenge test* serta diberi obat pembanding dengan konversi dosis terapi manusia. Obat pembanding tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji. Pemilihan obat pembanding disertai dengan justifikasi.
- d) Kelompok perlakuan (hewan uji yang dilakukan *challenge test*) diberi pakan standar dan dilakukan *challenge test* serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis.

**3) Pemberian senyawa *challenge test* atau induksi hewan uji.
Pemberian senyawa untuk ujiantang (*challenge test*)**

Ujiantang dengan vaksin

- a) Pemberian vaksin Hepatitis B berdasarkan dosis hasil orientasi pada uji pendahuluan pada hari ke 7 dan ke 14 perlakuan secara intraperitoneal (misalnya dapat menggunakan dosis 0,4 mL/ekor tikus 2 kali pemberian) untuk menghasilkan 20 μ L HbsAg.
- b) Pemberian vaksin TT (*Tetanus Toxoid*) berdasarkan dosis dan interval pemberian sesuai dengan hasil orientasi pada uji pendahuluan secara subkutan pada paha bagian luar sebelah kanan (misalnya dapat menggunakan dosis 0,2 mL/ekor mencit (25 μ g/mL) 2 kali pemberian).

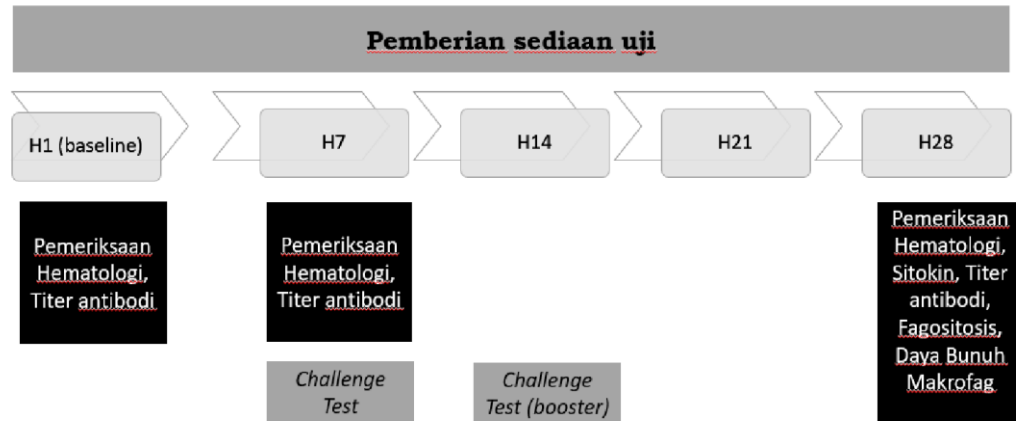
Ujiantang dengan bakteri

- c) Pemberian *S. aureus* secara intraperitoneal berdasarkan dosis hasil orientasi pada uji pendahuluan.
- d) Pemberian *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal dengan dosis 1 x 10⁵ CFU atau berdasarkan dosis hasil orientasi pada uji pendahuluan.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Pengujian imunostimulan untuk memelihara atau meningkatkan imunitas.

Pengelompokan hewan uji dibuat sesuai prosedur diatas. Selama jangka waktu tertentu misalnya 28 hari atau sesuai uji pendahuluan, hewan uji diberi sediaan uji dengan dosis yang telah ditentukan sesuai dengan tingkatan dosis dan pada kelompok kontrol positif diberi terapi standar. Pengambilan darah dan evaluasi parameter setiap hewan uji dilakukan dalam beberapa tahap (misalnya sesuai contoh pada Gambar 2). Selama masa pengujian hewan uji ditimbang setiap hari.



Gambar 2. Prosedur pemberian sediaan uji dan evaluasi parameter

Pemberian sediaan uji umumnya sebelum pemberian bahan ujiantang/ *challenge test*. Setelah beberapa waktu diberi ujiantang/ *challenge test* dan dapat diberikan *booster*, dilakukan pengukuran kadar IgG dan IgM spesifik antigen serta IFN- γ . Pengukuran parameter dilakukan pada baseline, hari ke 7 dan hari ke 14 atau berdasarkan hasil uji pendahuluan yang dipengaruhi oleh jenis antigennya. Secara umum, dilakukan pengukuran parameter (kecuali parameter ekspresi sitokin) pada 3 (tiga) titik yaitu (1) pada saat baseline (H1), (2) pada saat setelah diberi sediaan uji namun sebelum diberi bahan ujiantang (misalnya H7) serta (3) pada saat setelah diberi sediaan uji terakhir atau setelah diberi bahan ujiantang/ *challenge test* atau *booster* yang telah menunjukkan efek (misalnya H28)). Waktu pemberian sediaan uji dan evaluasi parameter dapat sesuai dengan hasil uji pada pendahuluan.

5) Pengukuran parameter imunostimulan

Sebelum dilakukan randomisasi dan perlakuan terhadap hewan uji, maka dilakukan pengukuran parameter hematologi sebagai baseline terhadap: jumlah leukosit, limfosit, eosinophil, basophil dan hemoglobin. Hanya hewan uji yang memiliki nilai kadar hematologi dalam rentang normal yang dapat dilakukan randomisasi dan perlakuan lebih lanjut.

Pengukuran Parameter Imunostimulan untuk Respon Imun Nonspesifik.

- 1) Parameter Uji Fagositosis

Carbon Clearance Test (hewan uji berbeda dari penelitian diatas (pemberian challenge test))

- a) Setelah pemberian sediaan uji selama jangka waktu tertentu misalnya 28 hari atau sesuai uji pendahuluan, dilakukan pengukuran aktivitas fagositosis dengan menggunakan uji *carbon-clearance*. Mencit diinjeksi dengan 0,1 mL/ kg BB suspensi karbon secara intravena melalui pembuluh darah di ekor. Pada menit ke-0 (sebelum penyuntikan karbon) dan menit ke-5, 10, 15 dan 20 setelah penyuntikan karbon dilakukan pengambilan darah. Sebanyak 25 µl darah ditambahkan ke dalam 4 mL larutan asam asetat 1% dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 640 nm menggunakan spektrofotometer UV-Visible atau menggunakan metode yang sesuai.
- b) Perhitungan konstanta kecepatan eliminasi karbon (K), indeks fagositosis (α) dan indeks stimulasi dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Konstanta Kecepatan Eliminasi} = \frac{\log \log OD5 - \log \log OD20}{t_2 - t_1}$$

$$\text{Indeks Fagositosis} = \frac{K^{\frac{1}{3}} \times \text{berat hewan}}{\text{berat hati} + \text{berat limfa}}$$

$$\text{Indeks Stimulasi} = \frac{\text{Indeks fagositosis kelompok uji}}{\text{Indeks fagositosis kelompok kontrol}}$$

Dimana:

OD5 = absorbansi pada menit ke-5

OD20 = absorbansi pada meni ke-20

T₁ = waktu pertama pengambilan darah

T₂ = waktu pertama pengambilan darah

Pengujian Daya Bunuh Makrofag

Dilakukan Pengujian Daya Bunuh Makrofag pada hewan uji yang dilakukan *Carbon Clearance Test* terhadap perhitungan NO (nitrat oksida), atau MPO (*myeloperoksidase*), atau beta glukorinidase berdasarkan metode yang sesuai.

2) Parameter Hematologi

Dilakukan pengukuran parameter hematologi setelah perlakuan

terhadap jumlah leukosit, limfosit, eosinophil, basophil dan hemoglobin dengan menggunakan *cell counter* otomatis atau metode yang sesuai.

3) Parameter Ekspresi Sitokin

Dilakukan pengukuran parameter ekspresi sitokin terhadap Interferon Gamma (IFN- γ) dengan menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sesuai dengan petunjuk informasi pada *manufacturer procedure* atau metode lain yang sesuai. Jika diperlukan dilakukan pengukuran parameter ekspresi sitokin *NK Cell Activity Analysis*, Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-a), Interleukin-10 (IL-10), interleukin-4 (IL-4) atau sitokin lainnya.

Pengukuran Parameter Immunostimulan untuk Respon Imun Spesifik.

Parameter Titer Antibodi

Dilakukan pengukuran aktivitas imunitas humoral melalui pengujian titer antibodi terhadap kadar IgG dan IgM spesifik terhadap paparan yang diberikan dengan menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sesuai dengan petunjuk informasi pada *manufacturer procedure* atau metode yang sesuai.

Dalam pengukuran parameter immunostimulan untuk respon imun spesifik dilakukan terlebih dahulu pengukuran parameter immunostimulan untuk respon imun nonspesifik.

c. Evaluasi

Dilakukan pengukuran terhadap pengujian fagositosis, parameter hematologi dan pengujian ekspresi sitokin untuk metode immunostimulan nonspesifik dan ditambahkan pengujian titer antibodi untuk metode immunostimulan spesifik setelah diberikan sediaan uji. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan pada kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi statistik yang dapat diikuti dengan relevansi pada klinik.

L. ANTI TUKAK LAMBUNG

1. Patofisiologi Tukak Lambung

Lambung sebagai reservoir/lambung makanan berfungsi menerima makanan/minuman, menggiling, mencampur dan mengosongkan makanan ke dalam duodenum. Lambung dilindungi terhadap faktor iritan oleh lapisan mukus/mukus barrier, epitel, tetapi beberapa faktor iritan seperti makanan, minuman dan obat anti inflamasi non steroid (OAINS), alkohol dan empedu yang dapat menimbulkan defek lapisan mukus dan terjadi difusi balik ion H⁺, sehingga timbul gastritis akut/kronik dan tukak gaster. Penyakit tukak peptik yaitu tukak lambung dan tukak duodenum merupakan penyakit yang masih banyak ditemukan dalam klinik terutama dalam kelompok umur di atas 45 tahun.

Tukak peptik secara anatomis didefinisikan sebagai suatu defek mukosa/submukosa yang berbatas tegas dapat menembus muskularis mukosa sampai lapisan serosa sehingga dapat terjadi perforasi. Secara klinis, suatu tukak adalah hilangnya epitel superfisial atau lapisan lebih dalam dengan diameter > 5 mm yang dapat diamati secara endoskopis atau radiologis.

Tukak lambung adalah gangguan ulseratif pada saluran cerna bagian atas yang dipicu adanya sekresi asam lambung berlebih dan adanya kehilangan faktor defensif. Tukak terjadi karena gangguan keseimbangan antara faktor agresif dengan faktor defensive. Penyebab umum terjadinya tukak lambung adalah penggunaan obat antiinflamasi nonsteroid (NSAID), adanya infeksi *Helicobacter pylori* (HP), dan faktor stress yang menyebabkan gangguan saluran cerna seperti sakit perut, mual, muntah, kehilangan berat badan, perdarahan dan perlukaan hingga komplikasi.

Faktor agresif penyebab tukak seperti: asam, pepsin, infeksi *Helicobacter pylori* (HP), obat NSAID. Sel parietal mengeluarkan asam lambung HCl, sel peptic atau zymogen mengeluarkan pepsinogen yang oleh HCl dirubah menjadi pepsin, dimana HCl dan pepsin adalah faktor agresif. Bahan iritan dapat menimbulkan defek barrier mukosa dan terjadi difusi balik ion H⁺. Histamin terangsang untuk lebih banyak mengeluarkan asam lambung, kemudian dilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh kapiler serta tukak. Faktor defensif yang apabila terjadi kekurangan dapat menyebabkan terjadinya tukak seperti: stress emosional berlebihan yang dapat meningkatkan kadar kortisol kemudian diikuti peningkatan sekresi asam lambung dan pepsinogen, serta gaya hidup tidak sehat seperti merokok dan konsumsi alkohol.

Terdapat beberapa teori mengenai patofisiologi tukak peptik. Beberapa dari teori tersebut yaitu:

- a. Faktor Asam Lambung “*No Acid Peptic Activity No Ulcer*” Shcwarz 1910; Pengaturan Sekresi Asam Lambung pada Sel Parietal

Sel parietal/oxyntic mengeluarkan asam lambung HCl, sel peptik/zimogen mengeluarkan pepsinogen yang oleh HCl dirubah jadi pepsin dimana HCl dan pepsin adalah faktor agresif terutama pepsin dengan mileu pH < 4 (sangat agresif terhadap mukosa lambung). Bahan iritan akan menimbulkan defek barier mukosa dan terjadi difusi balik ion H⁺.

Membran plasma sel epitel lambung terdiri dari lapisan-lapisan lipid bersifat pendukung barier mukosa. Sel parietal dipengaruhi faktor genetik, yaitu seseorang dapat mempunyai sel parietal yang besar/sekresi lebih banyak. Tukak gaster yang letaknya dekat pilorus atau dijumpai bersamaan dengan tukak duodenal biasanya disertai hipersekresi asam, sedangkan bila lokasinya pada tempat lain di lambung biasanya disertai hiposekresi asam.

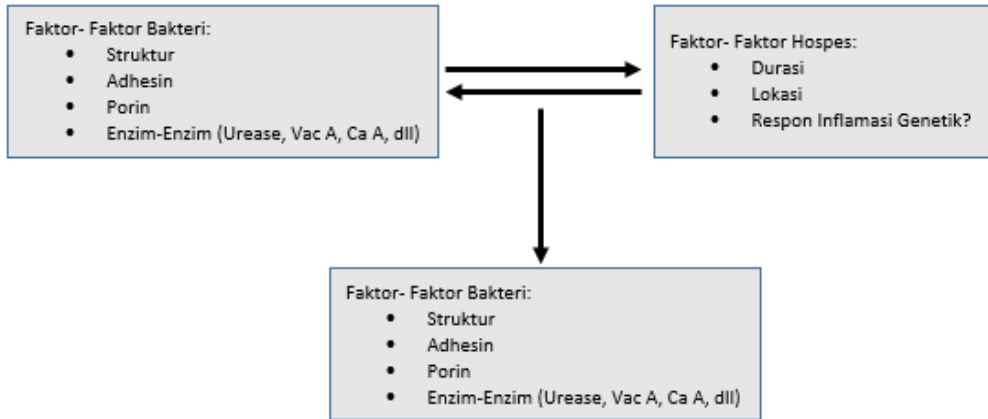
- b. Faktor Ketidakseimbangan Homesotasis Asam Lambung dari Shay and Sun: Balance Theory 1974

Tukak terjadi bila ada gangguan keseimbangan antara faktor agresif/asam dan pepsin dengan defensif (mukus, bikarbonat, aliran darah, prostaglandin), bisa faktor agresif meningkat atau faktor defensif menurun.

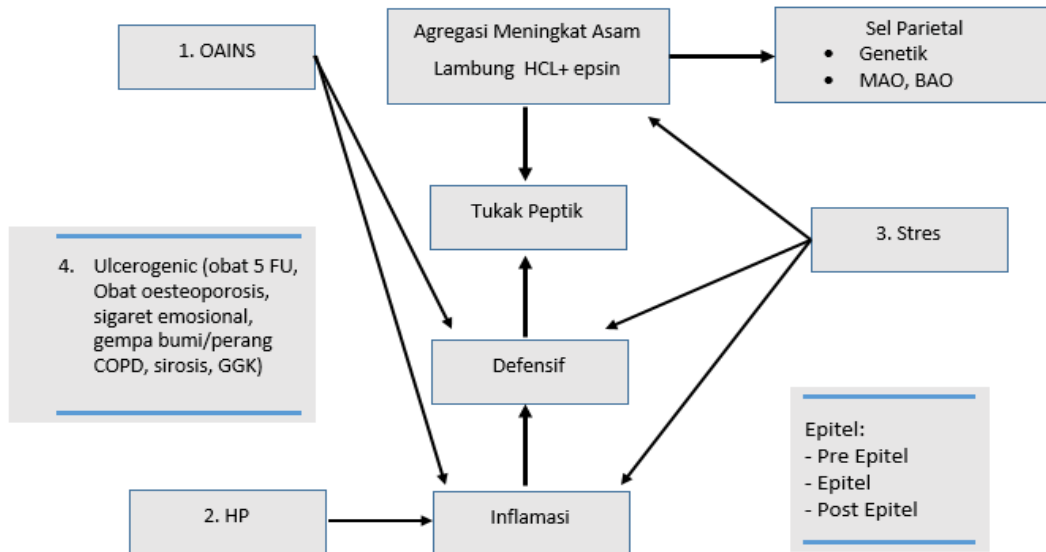
- c. Faktor Infeksi Helycobacter pylori (HP) “No HP No Ulcer” dari Warren and Marshall 1983

HP adalah kuman patogen gram negatif berbentuk batang/spiral, mikroaerofilik berflagela hidup pada permukaan epitel. Tukak gaster kebanyakan disebabkan infeksi HP (30-60%) dan OAINS sedangkan tukak duodenum hampir 90% disebabkan oleh HP. Garis besar pengobatan tukak peptik adalah eradikasi kuman HP serta pengobatan/pencegahan gastropati OAINS.

Faktor yang mempengaruhi terbentuknya kelainan gastroduodenal dinyatakan pada Gambar 3, serta berbagai penyebab tukak peptik dinyatakan pada Gambar 4.



Gambar 3. Faktor yang mempengaruhi terbentuknya kelainan gastrointestinal



Gambar 4. Berbagai penyebab tukak peptik

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Aktivitas anti tukak lambung dievaluasi pada hewan uji yang telah diinduksi dengan pemberian zat tertentu seperti Aspirin-HCl, etanol 96%, etanol 80%, Indometasin, Thioacetamide (TAA) 0,03%, Asam Asetat atau metode lain yang sesuai yang sudah menunjukkan keberhasilan induksi. Selanjutnya hewan uji diberi sediaan uji selama waktu yang ditentukan. Jika diperlukan dapat dipertimbangkan kombinasi beberapa metode. Evaluasi manfaat sediaan uji dengan membandingkan indeks tukak yang meliputi jumlah dan keparahan serta luas tukak dan dapat dilakukan pengujian ketebalan mukosa lambung dan histopatologi pada kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

b. Metode Uji

a) Alat, bahan dan hewan uji.

- a) Alat: kandang hewan, sonde, pinset, blade, alat bedah, mikroskop cahaya, stereomikroskop, peralatan histopatologi
- b) Bahan: bahan penginduksi tukak lambung, sediaan uji, bahan pembawa, bahan anestesi.
- c) Hewan Uji: Tikus

b) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor per kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pakan standar dan diberikan pembawa sediaan uji yang bersifat inert.
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji tukak lambung) diberi pakan standar dan induksi bahan kimia yang menyebabkan tukak lambung serta pembawa sediaan uji sampai akhir pengujian.
- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji tukak lambung) diberi pakan standar dan induksi bahan kimia yang menyebabkan tukak lambung serta diberi obat standar dengan konversi dosis terapi manusia. Obat standar tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- d) Kelompok perlakuan (hewan uji tukak lambung) diberi pakan standar dan induksi bahan kimia yang menyebabkan tukak lambung serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis atau berdasarkan atas penelitian pendahuluan.

c) Induksi hewan uji dan pemberian sediaan uji

Hewan dapat diinduksi dengan memberikan bahan penginduksi

sebagai berikut:

- a) Indometasin peroral dengan dosis 20-100 mg/kg BB atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan.
- b) Aspirin-HCl peroral dengan dosis 150 mg/kg BB atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan.
- c) Etanol 80-96% per oral 1-5 ml/kg BB atau dosis berdasarkan hasil orientasi pada uji pendahuluan.
- d) 150mM HCl/etanol absolut 40:60 v/v

Metode Uji Kuratif:

Dilakukan pemberian induksi dengan menggunakan bahan, dosis, selang waktu atau interval tertentu berdasarkan hasil uji pendahuluan. Keberhasilan induksi dapat dipertahankan dengan tetap memberikan bahan penginduksi yang tetap memperhatikan survival hewan uji. Hewan uji diberikan sediaan uji secara peroral sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan setelah dilakukan induksi (sesuai uji pendahuluan). Sediaan uji diberikan setiap hari selama beberapa hari misalnya selama 5-7 hari atau sesuai dengan tujuan pemberian (sesuai uji pendahuluan). Hewan uji dikorbankan setelah perlakuan pemberian sediaan uji selesai dan dilakukan pembedahan serta isolasi lambung untuk dianalisa pengamatan parameter untuk evaluasi indeks tukak lambung.

Metode Uji Preventif:

Hewan uji diberikan sediaan uji selama beberapa waktu tertentu misalnya 21 hari atau sesuai dengan hasil uji pendahuluan. Setelah pemberian sediaan uji hari terakhir, hewan uji dipuasakan selama 8-12 jam kemudian diinduksi dengan bahan penginduksi (misalnya 100 mg/kgBB indometasin secara p.o atau berdasarkan hasil uji pendahuluan) kecuali kelompok kontrol normal yang diberikan aquades. Setelah pemberian bahan penginduksi (4 jam untuk indometasin atau sesuai uji pendahuluan), hewan uji dikorbankan dan dilakukan pembedahan serta isolasi lambung untuk dianalisa pengamatan parameter untuk evaluasi indeks tukak lambung. Pengukuran parameter disampaikan pada bagian selanjutnya

Metode Uji Tukak Lambung yang Diinduksi Asam Asetat

Hewan uji dianastesi kemudian dibedah bagian perutnya untuk membuat ulkus menggunakan asam asetat. Asam asetat dituang ke mukosa lambung yang sebelumnya telah dibatasi oleh cincin (pada area

permukaan serosa lambung bagian corpus). Asam asetat 65% dituang lalu 45 detik kemudian larutan asam dibuang (ada yang menggunakan asam asetat 80% selama 30 detik). Dilakukan pemberian sediaan uji selama 2 minggu atau jangka waktu tertentu sesuai dengan tujuan pemberian. Hewan uji dikorbankan dan dilakukan pembedahan serta isolasi lambung untuk dianalisa pengamatan parameter untuk evaluasi indeks tukak lambung.

Metode Uji Tukak Lambung yang Diinduksi dengan Stress

a) Tukak yang diinduksi dengan pengekangan

Tiga puluh menit setelah pemberian sediaan uji, hewan uji dipindahkan ke tempat khusus yang pergerakannya dibatasi dengan ruang sempit atau pengikatan pada alat gerak (kaki depan dan kaki belakang). Setelah 24 jam, hewan uji dikorbankan dan diamati organ lambungnya di bawah binocular mikroskop.

b) Tukak yang diinduksi dengan perendaman air dingin

Metode ini memanfaatkan suhu air dingin yang menyebabkan munculnya peningkatan aktivitas myeloperoxidase sehingga mengakibatkan tukak peptik karena sekresi asam lambung berlebih. Setelah pemberian sediaan uji, hewan uji dikurung dalam kandang dan direndam air dingin selama 1 jam. Hewan uji dipindahkan dan diinjeksikan *azovan blue* (30 mg/kg) pada vena ekor (injeksi *azovan blue* berguna untuk menentukan skor tukak). Setelah 10 menit, hewan uji dibedah dan dilihat organ lambungnya.

c) Tukak yang diinduksi dengan perenangan

Beban aktivitas fisik juga dapat memicu munculnya stress. Berenang merupakan aktivitas fisik yang maksimal untuk tikus, karena terbukti lebih banyak terbentuk ulkus pada metode ini. Hewan uji dipaksa untuk berenang di air dengan kedalaman 30 cm yang mana membuat kaki tikus tidak dapat menyentuh dasar kolam. Dilakukan pemberian sediaan uji. Hewan uji dipaksa berenang dalam tabung silinder sedalam 30 cm selama 5 jam dalam air dengan suhu 23^o C. Hewan uji dikorbankan dan diambil organ lambungnya untuk dinilai keparahan tukak.

c. Pengukuran Parameter

Pengukuran parameter tukak lambung dilakukan terhadap parameter sebagai berikut:

a) Pengamatan sebelum hewan dikorbankan: perubahan fisik maupun tingkah laku serta adanya efek samping lain (diare/defekasi/urinasi berlebihan/liur berlebihan)

b) Indeks Tukak

1) Jumlah lesi yang terbentuk.

Dilakukan perhitungan jumlah tukak yang terbentuk.

2) Keparahan dari tukak dicatat dan diberi skor. Ulkus yang terlihat pada permukaan lumen lambung diamati. Parameter pengamatan ulkus terdiri dari jumlah dan jenisnya.

0 = tidak tukak

1 = tukak pada permukaan (*superficial*)

2 = tukak dalam

3 = perdarahan

3) Persentase hewan yang mengalami tukak

4) Dilakukan persentase hewan yang mengalami tukak pada setiap kelompok perlakuan.

5) Perhitungan Indeks Tukak

Indeks tukak dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$U_I = U_N + U_S + U_P \times 10^{-1}$$

UI = Indeks Tukak

U_N = Rata-rata jumlah tukak per hewan uji

U_S = Rata-rata skor keparahan tukak

U_P = Persentase hewan uji dengan tukak

c) Dilakukan perhitungan rasio proteksi yang diperoleh dengan perhitungan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Rasio proteksi} = \left(1 - \frac{UI \text{ Kelompok Perlakuan}}{UI \text{ Kelompok Kontrol}} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

UI Kelompok Perlakuan = Indeks Tukak Kelompok Perlakuan

UI Kelompok Kontrol = Indeks Tukak Kelompok Kontrol

d) Luas daerah tukak lambung

Dilakukan pengukuran luas daerah tukak lambung yang diperoleh dengan menggunakan metode yang sesuai misalnya metode ImageJ. Luasan luka dapat diukur dengan metode pembatasan area dan perhitungan luasan dalam milimeter persegi (mm^2).

Dapat dilakukan perhitungan *Ulcer Level Indeks* (ULI). Berikut adalah klasifikasi *ulcer area* yang selanjutnya digunakan untuk menghitung

nilai ULI:

Level I → *ulcer area* < 1 mm²

Level II → *ulcer area* 1-3 mm²

Level III → *ulcer area* > 3 mm²

Perhitungan ULI =

1x (untuk ulcer level I);

+2x (untuk ulcer level II);

+3x (untuk ulcer level III)

Rumus persentase area lesi:

% area lesi = (total area lesi)/(total area stomach) x100%

Rumus rasio kuratif:

% *cure ratio* = 100 - (*ulcer index control group* - *ulcer index test group*) / (*ulcer index control group*) x100%

e) Uji ketebalan mukus sebagai parameter tambahan.

Dapat dilakukan pengukuran parameter uji ketebatalan mukus dengan melakukan histopatologi lambung dengan pewarnaan yang sesuai yang diamati di bawah mikroskop cahaya yang dihubungkan dengan komputer yang dilengkapi software misalnya Optika Vision Light 2.1 atau metode yang sesuai untuk mengukur ketebalan mukosa.

f) Histopatologi lambung sebagai parameter tambahan.

Dapat dilakukan pengukuran parameter histopatologi lambung dengan pewarnaan yang sesuai untuk mengetahui kerusakan ulcer, deskuamasi, sel peradangan dan keparahan lesi.

Skoring histopatologi ditetapkan berdasarkan jurnal Alazzouni, A.S et al (2020)

1) Lesi *sporadic, punctuate*

2) Beberapa lesi kecil

3) Kerusakan mukosa extensive 1 area, atau multiple kerusakan sedang mukosa lambung

4) Beberapa kerusakan besar mukosa lambung

5) Beberapa kerusakan besar dengan perforasi lambung yang nyata

d. Evaluasi

Dievaluasi parameter tukak lambung yang diamati. 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 disamping signifikansi statistik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek.

M. PELANCAR ASI

1. Patofisiologi Pelancar ASI

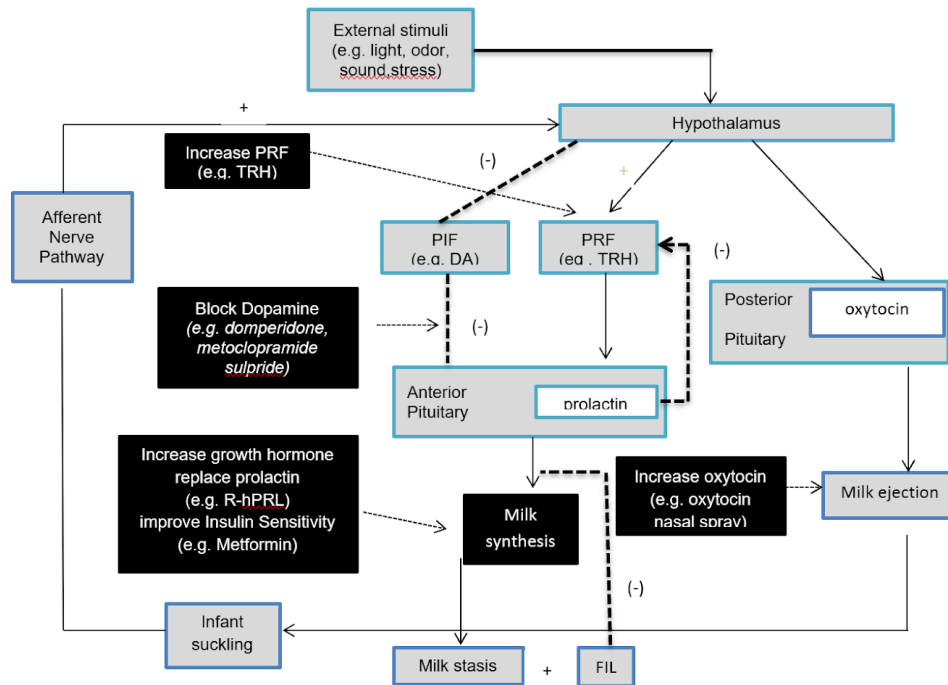
ASI secara umum merupakan sumber nutrisi dari infant (bayi) yang baru lahir, bersifat steril, suhu sesuai, mengandung protein, lemak, karbohidrat, mikronutrien dan bahan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. Kegagalan laktasi didefinisikan sebagai kebutuhan pemberian ASI untuk bayi dalam waktu 3 bulan setelah melahirkan karena pasokan ASI yang tidak mencukupi. Total kegagalan laktasi didefinisikan sebagai tidak adanya aliran susu secara total atau sekresi sedikit setelah menyusui setidaknya 7 hari. Usia, pendidikan, status sosial ekonomi, agama, struktur keluarga, dan perkotaan versus status pedesaan ibu, semua memiliki pengaruh pada terjadinya kegagalan laktasi.

Patofisiologi laktasi dipengaruhi oleh lingkungan hormon yang kompleks termasuk hormon reproduksi (estrogen, progesteron, laktogen, prolaktin, dan oksitosin) dan hormon metabolik (glukokortikoid, insulin, hormon pertumbuhan dan tiroid). Hormon reproduksi bertindak langsung pada kelenjar payudara, sedangkan hormon metabolik bertindak secara tidak langsung mengubah respon endokrin dan fluks nutrisi ke kelenjar susu. Selama kehamilan, tingginya kadar progesteron yang bersirkulasi menghambat proses sekretori kelenjar susu. Setelah proses melahirkan dan plasenta keluar, kadar progesteron menurun dengan cepat dan meningkatnya kadar prolaktin memicu awal lactogenesis II yang merupakan onset berlebih pada sekresi susu. Dua mekanisme serupa namun independen terlibat dalam pembentukan laktasi yang sukses (laktogenesis); mekanisme pertama menyebabkan rilis prolaktin dan yang kedua menginduksi pelepasan oksitosin, untuk menginduksi refleks pengeluaran susu. Hormon prolaktin berperan dalam melepaskan ASI ke dalam alveoli, kemudian hormone oksitosin merangsang epitel alveoli untuk berkontraksi agar dapat mengeluarkan ASI dari kelenjar payudara. Meskipun dua mekanisme ini serupa karena keduanya bisa diaktifkan dengan menyusui, keduanya dimediasi melalui dua jalur neuroendokrinologis yang sama sekali berbeda.

Melihat pentingnya peran prolaktin dan oksitosin dalam meregulasi sekresi dan ejsi ASI, hormon-hormon tersebut seringkali dijadikan target farmakologis untuk mempengaruhi pasokan ASI. Secara singkat, produksi prolaktin di pituitari anterior dipengaruhi keberadaan *prolactin inhibiting factors* (PIF) dan *prolactin releasing factors* (PRF), yang dikontrol oleh hipotalamus. Konsentrasi faktor-faktor tersebut dipengaruhi oleh stimulus eksternal seperti gerakan menghisap bayi, suara tangisan bayi dan stress. Kunci PIF utama adalah dopamin, yang mempunyai efek menghambat produksi prolaktin. Sebaliknya, hormon-hormon yang menstimulasi produksi prolaktin yaitu

thyrotropin releasing hormone, kortisol dan oksitosin. Beberapa hormon lain yang mempengaruhi kelenjar mammae untuk sintesis ASI yaitu *growth hormone*, prolaktin dan insulin.

Terdapat 3 kunci utama dalam pasokan ASI yang adekuat yaitu jaringan kelenjar mammae yang cukup, tingkat hormon yang normal dan pengeluaran ASI yang rutin dan efektif. Insufisiensi kelenjar mammae dapat disebabkan seperti operasi payudara (mastektomi, pengeluaran kista). Tingkatan hormon dapat dipengaruhi plasenta yang menetap, perdarahan postpartum yang parah, hipotiroidisme, tingginya tingkat stress dan ansietas, beberapa obat-obatan, anemia, diabetes, obesitas, *polycystic ovary syndrome*, merokok dan konsumsi alkohol. Terakhir, pengeluaran ASI yang rutin dan efektif dapat dipengaruhi oleh metode dan frekuensi pengeluaran ASI apabila tidak menyusui bayi secara langsung, atau ketidakmampuan bayi untuk menyusu akibat faktor seperti perlekatan yang kurang baik dan komplikasi kelahiran. Gambaran fisiologi laktasi dapat ditemukan pada Gambar 5.



Gambar 5. Fisiologi laktasi. Singkatan: TRH, thyrotrophin releasing hormone; PIF, prolactin inhibitory factor; PRF, prolactin releasing factor; DA, dopamin; R-hPRL, recombinant human prolactin; FIL, feedback inhibitor of lactation.

2. Metodologi Pengujian 1

a. Prinsip Uji

Hewan uji dilakukan proses perkawinan yaitu dengan

menempatkan satu tikus jantan dan empat tikus betina dalam satu kandang (hewan betina pada fase pro-estrus) atau satu jantan dan beberapa betina lainnya. Proses perkawinan diperiksa melalui metode *ulas vagina* setiap hari. Tikus yang menunjukkan adanya sumbat vagina dipisahkan dari kelompok perkawinannya ke kandang individu, rata – rata 21 hari tikus dipelihara sampai melahirkan dan masa laktasi terjadi.

b. Metode Uji

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: Kandang hewan uji, spuit injeksi, sonde oral, peralatan gelas, dan timbangan. kertas tissue, alat-alat gelas, timbangan hewan, timbangan analitik, jarum oral, tikus, peralatan untuk mengamati perilaku, alat bedah, makanan hewan, kit pereaksi, aquades, dll
- b) Bahan: Sediaan uji, obat standar,
- c) Hewan uji yang digunakan adalah Tikus Wistar / Sprague Dawley jantan bobot 200-250 g dan usia 8-10 minggu. Tikus Wistar / Sprague Dawley betina, berumur 8-10 minggu dengan berat badan antara 150 -175 g.

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji betina post-partum dikelompokkan secara acak menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5-8 ekor. Hewan uji, dikelompokkan sebagai berikut:

- a) Kontrol negatif diberi pakan standar serta pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan tidak mempengaruhi produksi ASI.
- b) Kelompok kontrol positif dengan pemberian domperidone atau metoklopramid (konversi dosis terapi manusia) yang dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- c) Kelompok perlakuan diberi pakan standar serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis atau berdasarkan uji pendahuluan

3) Penyiapan hewan uji post-partum

Hewan uji dilakukan proses perkawinan yaitu dengan menempatkan satu tikus jantan dan empat tikus betina dalam satu kandang (hewan betina pada fase pro-estrus) atau satu jantan dan beberapa betina lainnya. Proses perkawinan diperiksa

melalui metode *ulas vagina* setiap hari. Tikus yang menunjukkan adanya sumbat vagina dipisahkan dari kelompok perkawinannya ke kandang individu, rata – rata 21 hari tikus dipelihara sampai melahirkan dan masa laktasi terjadi. Tikus yang dipilih adalah yang melahirkan anak tikus dalam jumlah rentang berdekatan (misal yang memiliki 5 – 6 anak tikus).

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Pemberian sediaan uji dilakukan selama masa pemberian ASI yaitu setelah bayi tikus dilahirkan sampai minimal dua minggu atau jangka waktu tertentu sesuai dengan tujuan pemberian.

c. Parameter Pengukuran Produksi ASI

1) Pengukuran produksi air susu

Pengukuran produksi air susu dilakukan secara tidak langsung yaitu dengan penimbangan bobot anak tikus sebelum dan sesudah menyusui, selisih bobot anak tikus sebelum dan sesudah menyusui memiliki korelasi positif terhadap volume susu. Pengukuran produksi ASI diukur dari berat bayi pada hari ke 1, 3, 7 dan hari ke 14 laktasi.

a) Cara pengukuran 1:

- i. Pada saat pengukuran, anak tikus ditimbang pada bobot awal (w_1), selanjutnya diisolasi dari induknya selama 4 jam dan ditimbang kembali (w_2) (Sampson & Jansen 1984)
- ii. Setelah itu anak tikus dikembalikan kepada induk dan dibiarkan makan selama satu jam setelah itu ditimbang kembali (w_3)
- iii. Produksi susu setelah gavage diperkirakan sebagai $w_3 - w_2$. Nilai yang digunakan adalah $(w_2 - w_1)/4$. Nilai ini kemudian dikalikan dengan jumlah jam menyusui per hari dan ditambahkan ke perolehan menyusui harian.

b) Cara Pengukuran 2:

- i. Setiap hari berikutnya, anak tikus ditimbang (w_1) dan selanjutnya diisolasi terpisah dari induknya selama 4 jam anak tikus ditimbang (w_2) dan dikembalikan ke induknya untuk disusui selama 1 jam serta ditimbang lagi (w_3).
- ii. Berikutnya, anak tikus diisolasi terpisah dari induknya selama 4 jam, kemudian ditimbang lagi (w_4) sebelum

dikembalikan lagi ke induknya untuk disusui selama 1 jam dan akhirnya ditimbang kembali (w5). Anak tikus kemudian ditinggalkan bersama induknya sepanjang malam.

- iii. Produksi ASI setelah 18 dan 23 jam perlakuan dihitung berdasarkan perbedaan berat badan anak tikus sebelum dan sesudah menyusui dengan menggunakan rumus $[(w3-w2)$ dan $(w5-w4)]$. Pengukuran produksi tersebut dilakukan sampai hari ke 14.
- iv. Pengukuran produksi ASI setiap induk tikus mulai hari ke 3-15 akan dapat diketahui.
- v. Berat badan induk tikus diukur setiap hari dan perbedaan berat badan antara hari ke-3 dan ke-15 setelah persalinan dihitung.

c) Pengukuran Pertambahan Bobot Badan anak tikus

Pengukuran Pertambahan Bobot Badan (PBB) tikus dilakukan sejak usia anak tikus 3 hari hingga 14 hari. Pengukuran PBB ini dilakukan dengan menghitung selisih bobot badan anak tikus dari hari ke-3 dengan hari ke-1, dan juga hari ke-7 dengan hari ke-3 dan hari ke-14 dan ke-7 (3).

d) Penentuan kadar prolactin

Dilakukan pengukuran kadar prolaktin. Prosedur pengambilan sampel darah dilakukan pada hari 3 (saat estrus) perawatan, dua sampel plasma diambil sebelum dan lima sampel setelah oral, dengan interval 20 menit. Diambil sampel pada hari ke -7 dan hari ke -14 setelah diberikan perlakuan. Sampel darah disentrifugasi dan plasma disimpan pada 20 °C sampai pengukuran prolaktin.

e) Pengukuran Berat Badan Induk Tikus

Berat badan induk tikus diukur setiap hari dan perbedaan berat badan antara hari ke-3 dan ke-15 setelah persalinan dihitung.

f) Histologi Kelenjar Mammary

Pada akhir penelitian, jika diperlukan hewan uji dikorbankan dan dilakukan isolasi kelenjar mammary untuk dilakukan histologi dengan metode yang sesuai.

Pengamatan dilakukan pada adanya perbesaran duktus dan kelenjar *alveolar mammary*.

d. Evaluasi

Evaluasi dilakukan terhadap produksi air susu, penambahan bobot badan anak tikus, kadar prolaktin, perbedaan berat badan induk tikus dan histologi kelenjar mammary (jika diperlukan). Dilakukan analisis statistik untuk melihat homogenitas dan variasi antar kelompok, distribusi data pengukuran parameter yang dilakukan. 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.

N. MEMPERBAIKI GANGGUAN HATI

1. Patofisiologi Gangguan Hati

Hati merupakan organ utama dalam metabolisme dan eliminasi. Hati bersifat multifungsi dan berkaitan dengan metabolise karbohidrat, protein, lemak dan vitamin. Gangguan fisiologis hati dapat disebabkan oleh kelainan:

- a. Prehepatik, misalnya pada anemia hemolitik. Pada keadaan ini, fisiologis hati pada umumnya normal kecuali bilirubin.
- b. Intra hepatic atau hepatoseluler, misalnya pada hepatitis, sirosis dan karsinoma hepatis. Tes fisiologis hati pada keadaan ini umumnya ditandai dengan peningkatan enzim SGOT, SGPT, ALP, GGT, protein abnormal, dan bilirubin dapat bervariasi.
- c. Post hepatic atau obstruksi karena batu empedu dan tumor. Dalam keadaan ini bilirubin dan alkali fosfatase meningkat, SGOT dan SGPT dapat meningkat.

Pada pedoman lebih difokuskan pada gangguan hati intra hepatic atau hepatoseluler.

Hati memiliki 2 peranan penting pada tubuh, yaitu metabolisme dan detoksifikasi. Metabolisme hati meliputi metabolisme karbohidrat, lemak dan protein. Hati juga berfungsi sebagai detoksifikasi darah dari benda asing. Peran ini dimainkan oleh sel Kupffer. Obat dan seringkali bahan toksik dimodifikasi oleh hati dan dibuat menjadi inaktif atau larut air dengan mengkonjugasikan dengan senyawa kimia lain. Dengan proses ini, hati memberi sinyal pada tubuh untuk mengekskresikan zat-zat tersebut. Pedoman farmakodinamik ini terkait dengan fungsi detoksifikasi hati.

Hati memiliki peran utama dalam metabolisme xenobiotik dan berhubungan dengan saluran pencernaan. Hati sangat rentan mengalami kerusakan yang diakibatkan dari obat-obatan atau xenobiotik. Hampir 75% darah yang mencapai hati berasal dari organ pencernaan dan limpa melalui vena porta, oleh karena itu obat-obatan dan xenobiotik berada dalam bentuk terkonsentrasi. Kerusakan hati terjadi karena metabolit aktif yang berasal dari obat-obatan dan xenobiotik bereaksi dengan makromolekul seluler seperti protein, lipid dan asam nukleat yang mengakibatkan disfungsi protein, lipid peroksidase, kerusakan DNA dan stress oksidatif.

Hati mensintesis, mengkonsentrasikan dan mensekresi asam empedu dan mengekskresikan bahan toksik lain seperti bilirubin. Cedera yang diinduksi oleh obat (*Drug-Induced injury*) pada hepatosit dan sel duktus empedu dapat menjadikan terjadinya kolestasis. Kolestasis, di lain pihak, menyebabkan akumulasi asam empedu yang toksik di intrahepatik dan ekskresi produk yang dapat menambah cedera hepar. Hepar mempunyai kapasitas regeneratif yang tinggi namun regenerasi hepatosit yang rusak karena nekrosis dan kematian sel apoptosis dapat menutupi deteksi drug-induced injury. Ditambah, respon hepatosit yang aktif berproliferasi menjadikan hepar sebagai target karsinogen.

Sel non parenkimal hepatic, sel Kupffer, endotelial sinusoidal dan sel stellata (penyimpan lemak) dan leukosit baru seperti monosit dan neutrofil adalah sumber dari sitokin proinflamasi dan kemokin serta oksigen reaktif dan spesies nitrogen, yang dapat menambah stress oksidatif pada kejadian cedera yang diinduksi oleh toksikan dan iskemia/reperfusi. Sel Kupffer juga mempunyai peran penting pada cedera hepar karena konsumsi etanol. Sel endotelial sinusoidal secara selektif sensitif terhadap cedera iskemia dingin/reperfusi yang dapat menyebabkan kegagalan graft setelah transplantasi dan menjadikan agen kemoterapi kanker menyebabkan penyakit veno-occlusive. Sel stellata yang teraktivasi mensintesis kolagen yang apabila terjadi over produksi dapat menjadi fibrosis hepatis dan sirosis.

Mekanisme hepatotoksitas dari obat-obatan dan xenobiotik lainnya dalam konteks fisiologi hepar metabolisme dan biologi sel dibagi menjadi:

a. Apoptosis hepatosit yang diinduksi asam empedu

Pembentukan asam empedu merupakan fungsi esensial hepar dan kegagalan pembentukan asam empedu adalah patofisiologi kolestasis. Retensi konstituen asam empedu pada hepatosit pada saat kolestasis diasosiasikan dengan apoptosis hepatosit. Asam empedu yang hidrofobik terutama sangat hepatotoksik, dan mereka terakumulasi pada hepar pada penyakit kolestasis. Kegagalan mensekresi asam empedu menghasilkan cedera hepar, sirosis dan kematian dari gagal fungsi hepar.

b. Adhesi molekul dan stress oksidan pada cedera hepar inflamasi

Sepsis/endotokseミア, hepatitis alkoholik dan cedera iskemik-reperfusi, serta beberapa hepatotoksitas dari obat-obatan tertentu dikarakterisasikan dengan inflamasi sistemik dan lokal dengan masuknya makrofag dan neutrofil ke dalam pembuluh darah hepar. Fungsi utama

fagosit tersebut adalah untuk merusak mikroorganisme yang menginvasi dan menghilangkan sel-sel mati serta debris sel sebagai persiapan untuk regenerasi jaringan. Namun karena sifat mediator toksik yang dihasilkan oleh fagosit-fagosit tersebut, sel sehat juga dapat terkena efeknya dan dapat memperparah cedera hepar yang ada sebelumnya.

c. Toksisitas CYP2E1-Dependent pada Sel HepG2

Cytochrome P450E1 (CYP2E1) memetabolisasi dan mengaktivasi banyak substrat yang toksik, seperti etanol, tetraklorida karbon, asetaminofen, dan N-nitrosodimetilamin, menjadi produk yang lebih toksik. Metabolisme etanol yang CYP2E1-dependent memproduksi stress oksidatif melalui pembentukan reactive oxygen species (ROS). Induksi CYP2E1 oleh etanol merupakan pathway sentral dimana etanol menghasilkan stress oksidatif dan muncul bersamaan dengan cedera hepar alkoholik dan peroksidasi lipid. Patologi kerusakan hepar yang diinduksi etanol berkorelasi dengan tingkat CYP2E1 dan peroksidasi lipid yang meningkat, yang dapat dihambat oleh inhibitor CYP2E1.

d. Peroksinitrit pada hepatotoksisitas yang diinduksi obat (drug-induced injury)

Pada kasus overdosis, asetaminofen menyebabkan terjadinya nekrosis sentrilobular hepar. Metabolisme cytochrome P450 menjadi N-asetil-p-benzoquinoneimine (NAPQI) merupakan langkah kritis. NAPQI bereaksi terhadap glutathion hepar (GSH) dan menjadikan GSH berkurang sampai 90%. NAPQI secara kovalensi terikat pada protein. Uji imunokimia mengindikasikan bahwa lokasi selular ikatan kovalennya berkorelasi dengan toksisitas.

e. Hepatotoksisitas karena disfungsi mitokondria

a. Steatosis mikrovesikular

Gangguan mitochondrial fatty acid β -oxidation menyebabkan steatosis mikrovesikular, yang dikarakterisasi dengan akumulasi vesikel lipid kecil pada sitoplasma hepatosit. Karena oksidasi mitokondrial yang buruk, nonesterified fatty acids (NEFAs) berakumulasi pada hepar dan menjadi trigliserida.

b. Steatohepatitis nonalkoholik (NASH)

NASH berkembang secara progresif pada pasien dengan steatosis yang dapat menjadi kematian sel, badan Mallory, infiltrar sel polinuklear, fibrosis dan sirosis. NASH muncul pada pasien dengan obesitas/hipertrigliseridemia/sindroma resisten insulin, atau dapat

diinduksi oleh amiodaron kronis, perheksilin atau pemberian dietilaminoetoksiheksesestrol.

c. Hepatitis sitolitik

Hepatitis sitolitik merupakan lesi hepar yang severe yang dapat menyebabkan kegagalan hepar dan terlibat dalam uncoupling mitokondrial dan inhibisi respiratori. Mekanisme lain adalah onset mitochondrial permeability transition (MPT) disebabkan oleh pembukaan pori-pori permeability transition (PT) pada membran dalam mitokondrial.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Hewan uji diinduksi dengan pemberian zat tertentu yang dapat menginduksi gangguan /kerusakan fungsi hati, ditunjukkan dengan adanya peningkatan parameter enzim hati dengan minimal pengujian terhadap *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT), *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT), *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT) dan *Alkaline Phosphatase* (ALP). Selanjutnya hewan uji diberikan sediaan uji dalam jangka waktu tertentu kemudian diamati penurunan parameter enzim hati (SGPT, SGOT, GGT, ALP dan bilirubin total) serta hasil histologi hati serta parameter lain yang dibutuhkan sesuai dengan metode pengujian. Evaluasi khasiat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan penurunan parameter enzim hati dan hasil histologi hati pada kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

b. Metode Pengujian

1) Alat, Bahan dan Hewan Uji

- a) Alat: kandang hewan, *sprit* injeksi, sonde oral, alat gelas, alat bedah steril, mikroskop, spektrofotometer dan timbangan
- b) Bahan: sediaan uji, induktor/bahan penginduksi gangguan fungsi hati (misalnya Karbon Tetra Klorida (CCl₄), parasetamol, D-Galactosamine, thioacetamide dan Lipopolisakarida (LPS), dll), pembawa yang sesuai dan obat pembanding kontrol positif
- c) Hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan strain Wistar atau Sprague Dawley atau mencit strain Wistar.

2) Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal (hewan uji normal) diberi pembawa sediaan uji yang bersifat inert
- b) Kelompok kontrol negatif (hewan uji dengan gangguan fungsi hati) diberi pembawa sediaan uji yang bersifat inert dan bahan penginduksi gangguan/kerusakan fungsi hati
- c) Kelompok kontrol positif (hewan uji dengan gangguan fungsi hati) diberi bahan penginduksi gangguan/kerusakan fungsi hati dalam pembawa sediaan uji yang bersifat inert serta diberi obat pembanding dengan konversi dosis terapi manusia seperti curcuminoid atau silymarin. Pembawa tersebut dilarutkan dalam pembawa yang sama dengan sediaan uji.
- d) Kelompok perlakuan (hewan uji dengan gangguan fungsi hati) diberi bahan penginduksi gangguan/kerusakan fungsi hati dalam pembawa sediaan uji yang bersifat inert serta diberi sediaan uji minimal tiga kelompok dosis.

3) Induksi Hewan Uji

Induksi gangguan/kerusakan fungsi hati dapat dilakukan dengan salah satu cara berikut:

- a) Induksi dengan kombinasi D-Galaktosamin dan Lipopolisakarida
Dilakukan induksi menggunakan kombinasi D-Galaktosamin dosis 200-400 mg/kg dan Lipopolisakarida 10 µg/kg secara intraperitoneal 1 kali atau sesuai dengan hasil orientasi pada uji pendahuluan. Pemberian sediaan uji dilakukan pada hari berikutnya selama 2 (dua) hari. Kondisi penelitian juga dapat mengacu pada hasil uji pendahuluan. Metode pengujian ini lebih menggambarkan kondisi kerusakan hati pada manusia.
- b) Parasetamol
Untuk induksi gangguan/kerusakan fungsi hati akut, hewan uji diinduksi dengan parasetamol dosis tunggal 1 – 3 g/kg bb (p.o) pada hari ke 10; 5 atau 3 perlakuan (2). Sedangkan untuk induksi kronis, hewan uji diberikan parasetamol dosis 750 mg/kg bb (p.o) yang dilarutkan dalam larutan saline selama 3 minggu bersamaan dengan pemberian sediaan uji (5). Pemberian sediaan uji dilakukan selama 7 (tujuh) hari setelah dilakukan induksi. Kondisi penelitian juga dapat mengacu pada hasil uji pendahuluan.
- c) Induksi dengan Thioacetamide
Untuk induksi gangguan/kerusakan fungsi hati kronis, hewan uji

diberi thioacetamide dosis 200 mg/kg bb (i.p) 2 kali seminggu selama 8-12 minggu atau 300 mg/kg secara intraperitoneal 2 kali selama 24 jam atau berdasarkan hasil uji pendahuluan-(8,9). Induksi dengan thioacetamide secara intraperitoneal 2 kali seminggu selama 12 minggu menyebabkan sirosis hati. Pemberian sediaan uji dilakukan selama 4-6 minggu setelah dilakukan induksi atau sesuai uji pendahuluan. Metode pengujian ini sesuai untuk pemberian kronik dengan tujuan memberikan gambaran sirosis hati. Kondisi penelitian juga dapat mengacu pada hasil uji pendahuluan.

d) Induksi dengan virus

Hewan uji kelinci berumur 9 minggu diinduksi secara intramuskular dengan isolat RHDV (Rabbit Hemorrhagic Disease Virus) dosis 2×10^4 hemagglutination unit. Tiga puluh enam jam setelah induksi terjadi peningkatan transaminase, laktat dehidrogenase dan bilirubin total. Pemberian sediaan uji dilakukan selama selang waktu tertentu sesuai dengan tujuan pemberian. Metode pengujian ini lebih menyerupai kondisi kerusakan hati pada manusia akibat infeksi virus. Kondisi penelitian juga dapat mengacu pada hasil uji pendahuluan.

e) CCl_4

Induksi gangguan/kerusakan fungsi hati kronis, hewan uji diberi CCl_4 dosis 1 mg/kg yang dilarutkan dalam minyak zaitun (1:1) (p.o) 2 kali seminggu selama 8 minggu. Pemberian sediaan uji dilakukan selama selang waktu tertentu sesuai dengan tujuan pemberian. Sedangkan untuk induksi gangguan/kerusakan fungsi hati akut, hewan uji diberi CCl_4 dosis 1 mg/kg bb yang dilarutkan dalam minyak zaitun (1:1) (p.o) pada hari ke 2 hingga ke 5 (4 kali pemberian) dari 5 hari perlakuan dengan sediaan uji (4). Selain itu induksi akut dapat dilakukan dengan pemberian CCl_4 (single i.p) dosis 1 mL/kg bb yang dilarutkan dalam dalam minyak zaitun (2:5) pada hari ke-13 setelah 2 minggu perlakuan (5). Karbon tetraklorida (CCl_4) pada dosis 125, 250, dan 500 mg/kg. Metode pengujian ini kurang menggambarkan kondisi kerusakan hati pada manusia. Kondisi penelitian juga bisa mengacu pada hasil uji pendahuluan.

4) Pemeriksaan Parameter

Pemeriksaan parameter wajib untuk mengetahui penurunan fungsi

hati dilakukan terhadap parameter enzim hati meliputi SGPT, SGOT, GGT, ALP, bilirubin total, serta hasil histologi hati yang menunjukkan adanya gambaran kerusakan pada sel hati.

Selain itu, dapat dilakukan pemeriksaan parameter lain sesuai dengan metode pengujian misal untuk kondisi sirosis menggunakan induksi LPS dilakukan pemeriksaan TNF α , NF κ b dan Interleukin.

Hasil histologi hati dilakukan pewarnaan yang sesuai untuk dievaluasi untuk pengembangan fibrosis dengan penilaian skor yang sesuai misalnya menggunakan skor 0 – IV, yaitu:

0 : hati normal

I : Septa jaringan ikat kecil dan pendek tanpa pengaruh pada struktur lobulus hepatic

II: Septa jaringan ikat besar, mengalir bersama dan menembus ke dalam parenkim. Kecenderungan berkembang nodul.

III: Transformasi nodular pada hati dengan hilangnya struktur lobulus hati.

IV: Pembentukan dan deposisi jaringan ikat yang berlebihan dengan pembagian regenerasi lobulus dan dengan perkembangan scar.

c. EVALUASI

Evaluasi dilakukan dengan pengukuran penurunan parameter enzim hati yaitu SGPT, SGOT, GGT, ALP dan bilirubin total serta hasil histologi hati dan pemeriksaan parameter lainnya yang diperlukan sesuai dengan metode pengujian setelah pemberian sediaan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dilakukan analisis statistik untuk melihat homogenitas dan variasi antar kelompok, distribusi data pengukuran parameter yang dilakukan. 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.

O. MEMPERBAIKI NAFSU MAKAN/ PERBAIKAN STATUS GIZI

1. Patofisiologi

Malnutrisi adalah keadaan patofisiologis akibat dari kekurangan atau kelebihan secara relative maupun absolut satu atau lebih zat gizi. Terdapat 4 bentuk malnutrisi, diantaranya adalah:

- (1) *Under nutrition*, kekurangan konsumsi pangan secara relative atau absolut untuk periode tertentu
- (2) *Specific deficiency*, kekurangan zat gizi tertentu
- (3) *Over nutrition*, kelebihan konsumsi pangan untuk periode tertentu
- (4) *Imbalance*, karena disproporsi zat gizi, misalnya ketidak seimbangan LDL (*Low Density Lipoprotein*), HDL (*High Density Lipoprotein*), dan VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*)
- (5) Kurang energi protein (KEP), yaitu seseorang yang kurang gizi disebabkan oleh rendahnya konsumsi energi protein dalam makanan sehari-hari atau gangguan penyakit tertentu.

Mekanisme terkait dengan defisiensi asupan dan peningkatan kebutuhan dengan konsekuensi klinis yang berbeda-beda. Adaptasi terhadap defisiensi nutrisi bertujuan untuk mempertahankan kondisi tubuh melalui optimalisasi penyimpanan energi bersamaan dengan mempertahankan cadangan protein. Hal tersebut dicapai dengan mengurangi metabolisme basal dan mengurangi sekresi faktor anabolik dan secara moderat meningkatkan hormon katabolik. Pada kondisi stress atau cedera, tubuh terkadang mengambil cadangan protein untuk memproduksi glukosa yang dibutuhkan oleh sel-sel tubuh. Efek aktivitas inflamasi pada massa sel tubuh membuat beberapa organ kehilangan cadangan protein dan beberapa mendapatkan tambahan protein. Respon dari stress terdiri dari kehilangan massa otot, protein tulang dan komponen solid lainnya (kalsium dan fosfat), dan organ yang mendapatkan tambahan protein adalah organ yang bertanggung jawab mempertahankan tubuh dari stress tersebut. Terdapat peningkatan proliferasi sistem imun (hati, limpa, sel-sel imun pada tubuh) dan peningkatan sintesis protein fase akut. Meski demikian, efek keseluruhan dari redistribusi protein pada tubuh adalah kehilangan protein.

Efek dari kehilangan massa sel tubuh dan adanya aktivitas inflamasi juga mempengaruhi kualitas hidup. Pada manusia lanjut usia dan pasien dengan penyakit kronis, harapan hidup, performa fisik dan kemampuan kognitif secara signifikan menurun bersamaan dengan menurunnya massa otot.

Manifestasi yang mungkin ditemukan pada hewan yang muda yaitu berat badan yang rendah dan gejala awal stunting. Pada kelas terapi ini difokuskan kepada keadaan malnutrisi pada kondisi *undernutrition* yang ditujukan untuk memperbaiki nafsu makan/ perbaikan status gizi.

2. Metodologi Pengujian

a. Prinsip Uji

Dengan menggunakan hewan uji yang sesuai, dilakukan pengujian nafsu makan dengan didahului induksi yang sesuai sehingga menghasilkan hewan uji yang mengalami malnutrisi dengan kriteria *undernutrition*.

Hewan uji diberikan sediaan uji selama beberapa waktu tertentu dan dilakukan pemeriksaan beberapa parameter yang dapat mengindikasikan perbaikan nutrisi diukur seperti kenaikan berat badan mengacu pada indeks Lee, rasio efisiensi *food intake*, kadar *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) dan jika diperlukan kadar albumin, kadar hemoglobin dan ferritin. Evaluasi manfaat sediaan uji dilakukan dengan membandingkan parameter uji pada kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai.

b. Metode Uji

1) Alat, bahan dan hewan uji

- a) Alat: kandang hewan uji, sonde oral, timbangan, peralatan pengujian kadar IGF-1, albumin, hemoglobin dan ferritin
- b) Bahan: sediaan uji, pembawa, obat pembanding
- c) Hewan uji: tikus

2) Pengelompokan hewan uji

Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok dengan jumlah 5 – 8. Hewan uji dikelompokkan menjadi beberapa kelompok sebagai berikut:

- a) Kelompok kontrol normal hewan normal
- b) Kelompok kontrol negatif hewan yang diinduksi malnutrisi tetapi tidak diberikan perlakuan apapun
- c) Kelompok kontrol positif (jika diperlukan) hewan yang diinduksi malnutrisi atau ikut dalam sesi uji dan diberikan obat peningkat nafsu makan.
- d) Kelompok perlakuan hewan yang diinduksi malnutrisi dan diberikan sediaan uji minimal tiga kelompok dosis.

3) Induksi hewan uji

- a) Metode induksi dengan pakan diet isokalori protein rendah
Hewan uji akan diberi pakan diet isokalori protein rendah selama beberapa hari untuk menginduksi keadaan malnutrisi. Dilakukan uji pendahuluan sebagai referensi untuk metode induksi malnutrisi pada studi utama.

Diet rendah protein diberikan terbatas 5 g/100 g berat badan/hari selama total 8 minggu dengan evaluasi setiap 2 minggu dimulai dari minggu ke 4, kondisi malnutrisi dipertahankan selama 4 minggu selanjutnya atau sesuai dengan hasil orientasi pada uji pendahuluan.

Dilakukan evaluasi menggunakan parameter seperti kenaikan berat badan termasuk indeks Lee, tingkat Hb, Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), serum iron (Fe)/ kadar ferritin, serum albumin, dan rasio efisiensi intake pakan di akhir minggu ke 4, perlakuan dilanjutkan sampai 8 minggu dan evaluasi parameter juga dilakukan pada akhir minggu ke 6 dan minggu ke 8. Kemudian hasil akan dibandingkan pada akhir studi preliminary untuk menentukan metode induksi malnutrisi yang terbaik. Air diberikan ad libitum selama induksi namun dimonitor setiap hari untuk mengukur intake sehari-hari.

Hewan uji pada grup kontrol diberikan diet standar yang terdiri dari minimal 12% protein, sementara kelompok yang diinduksi malnutrisi, diet akan diubah 3% - 5% protein atau sesuai dengan hasil uji pendahuluan. Walaupun makanan defisiensi protein, jumlah kalori dijaga agar mendekati pakan normal (isokalori).

- b) Metode induksi dengan hipokalori/ undernutrition
Hewan uji diberikan pakan dengan gizi kurang dengan protein kalori terbatas selama waktu tertentu misalnya 26 hari atau berdasarkan hasil uji pendahuluan.
Ukuran keberhasilan induksi malnutrisi yaitu pada penurunan lebih dari 20% berat badan atau berdasarkan statistik bermakna dan klinisnya.

4) Prosedur pemberian sediaan uji

Hewan uji diberikan sediaan uji secara peroral sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan setelah dilakukan induksi (sesuai uji pendahuluan). Sediaan uji diberikan setiap hari selama 28 hari atau sesuai dengan tujuan pemberian.

5) Pengukuran parameter penelitian

a) Berat Badan dan Monitoring Intake Pakan

Berat badan hewan uji dimonitor setiap hari sebelum perlakuan harian dan intake pakan juga diukur setiap hari. Selama fase induksi, hewan uji selain kelompok kontrol normal diberi pakan dengan kuantitas terbatas 5 g/100 g berat badan/hari diet rendah protein.

Tidak ada batasan restriksi pakan pada seluruh kelompok di fase perlakuan, namun konsumsi pakan akan dimonitor dan direkam setiap hari untuk menentukan perkembangan dan efisiensi makanan. Efisiensi makanan adalah rasio antara kenaikan berat badan (g) dan intake diet total selama eksperimen (g).

Indeks Lee digunakan untuk pemeriksaan malnutrisi, dihitung dengan membagi akar berat badan (g) dengan Panjang nasoanal (cm) kemudian dikali 1000.

b) Analisis Biokimiawi Serum

Dilakukan analisis biokimia serum terhadap kadar *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1) dengan metode yang sesuai. Analisis terhadap kadar albumin, ferritin dan hemoglobin dapat dilakukan jika diperlukan dengan metode yang sesuai.

c. Evaluasi

Dilakukan pengukuran terhadap parameter yang diamati. Selanjutnya dievaluasi signifikansi perubahan parameter uji pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan pada kelompok kontrol negatif menggunakan uji statistik yang sesuai. Kesimpulan hasil harus menggunakan signifikansi statistik yang diikuti dengan relevansi pada klinik. Kelompok kontrol positif digunakan hanya untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan sah, bukan untuk menunjukkan kesetaraan efek. Apabila tidak memungkinkan dapat tidak menggunakan kelompok kontrol positif.

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

PENNY K. LUKITO