

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Warfarin

II.1.A. Karakteristik Umum Warfarin



Gambar.1. Sediaan Warfarin (Coumadin®)

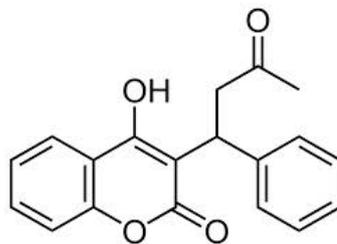
Antikoagulan digunakan untuk mencegah pembekuan darah dengan jalan menghambat pembentukan atau menghambat fungsi beberapa faktor pembekuan darah. Atas dasar ini antikoagulan diperlukan untuk mencegah terbentuk dan meluasnya trombus dan emboli, maupun untuk mencegah bekunya darah in vitro. Pada trombus yang sudah terbentuk, antikoagulan hanya mencegah membesarnya trombus dan mengurangi kemungkinan terjadinya emboli, tetapi tidak memperkecil trombus.³

Warfarin merupakan anti koagulan oral yang mempengaruhi sintesa vitamin K yang berperan dalam pembekuan darah sehingga terjadi deplesi faktor II, VII, IX dan X. Warfarin bekerja di hati dengan menghambat karboksilasi vitamin K dari protein prekursorinya. Karena waktu paruh dari masing-masing faktor pembekuan darah tersebut, maka bila terjadi deplesi faktor VII waktu

protrombin sudah memanjang. Tetapi efek anti trombotik baru mencapai puncak setelah terjadi deplesi keempat faktor tersebut. Jadi efek anti koagulan dari warfarin membutuhkan waktu beberapa hari karena efeknya terhadap faktor pembekuan darah yang baru dibentuk bukan terhadap faktor yang sudah ada disirkulasi.³

Warfarin tidak mempunyai efek langsung terhadap trombus yang sudah terbentuk, tetapi dapat mencegah perluasan trombus. Warfarin telah terbukti efektif untuk pencegahan stroke kardioembolik. Karena meningkatnya resiko pendarahan, penderita yang diberi warfarin harus dimonitor waktu protrombinnya secara berkala.³

Warfarin mempunyai nama kimia 4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)-2H-chromen-2-one, rantai karbon $CC(=O)CC(C1=CC=CC=C1)C1=C(O)C2=CC(OC1=O)C=CC=C2$, dengan rumus kimia $C_{19}H_{16}O_4$, dan struktur kimia:



Gambar.2. Sturuktur kimia warfarin

Warfarin mempunyai sediaan berbentuk tablet dengan dosis bervariasi mulai dari 1 mg hingga 10 mg.



Gambar.3. Sediaan tablet warfarin

II.1.B. Farmakologi.

Farmakokinetik :

- Absorpsi sempurna secara oral dengan puncak plasma selama 4 jam.³¹
- 99 % terikat protein plasma.³¹
- Terdistribusi kecil (0,4 l/kg) dengan pemberian IV ataupun IM.³¹
- Proses antikoagulan 24 jam setelah pemberian, kadar puncak 72-96 jam.³¹
- Durasi kerja: 2-5 jam; konsistensi dengan paruh waktu vitamin K-dependent clotting factors: F.II (60 jam) ; VII (4-6 jam) ; IX (24 jam) ; X (48-72 jam) ; protein C dan S (8-30 jam).³¹
- Metabolisme: secara aktif oleh enzim sitokrom P-450.³¹
- Tereliminasi oleh metabolisme hepar dengan kecepatan 0,2 l/h/70Kg).³¹
- Waktu paruh \pm 1 minggu, terjadi 20-60 jam, \pm 40 jam.³¹
- 92 persen diekskresikan di urin dan feses.³¹

Farmakodinamik :

- Sintesis protrombin dihambat 50% saat konsentrasi Warfarin mencapai 1,5 mg.³²
- Absorpsinya berkurang bila ada proses digestif.³

Indikasi :

- Untuk profilaksis dan pengobatan komplikasi tromboembolik yang dihubungkan dengan fibrilasi atrium dan penggantian katup jantung, serta sebagai profilaksis terjadinya emboli sistemik setelah infark miokard(*FDA approved*).³
- Profilaksis TIA atau stroke berulang yang tidak jelas berasal dari problem jantung.³

Kontraindikasi :

Semua keadaan di mana resiko terjadinya perdarahan lebih besar dari keuntungan yang diperoleh dari efek anti koagulannya, termasuk pada kehamilan, kecenderungan perdarahan atau *blood dyscrasias*, dll.³

Interaksi obat :

Warfarin berinteraksi dengan sangat banyak obat lain seperti asetaminofen, beta bloker, kortikosteroid, siklofosfamid, eritromisin, gemfibrozil, hidantoin, glukagon, kuinolon, sulfonamid, kloramfenikol, simetidin, metronidazol, omeprazol, aminoglikosida, tetrasiklin, sefalosporin, anti inflamasi non steroid, penisilin, salisilat, asam askorbat, barbiturat, karbamazepin dll. ³

Efek samping

Perdarahan dari jaringan atau organ, nekrosis kulit dan jaringan lain, alopecia, urtikaria, dermatitis, demam, mual, diare, kram perut, hipersensitivitas dan priapismus.³

Dosis :

Dosis inisial dimulai dengan 2-5 mg/hari dan dosis pemeliharaan 2-10 mg/hari. Obat diminum pada waktu yang sama setiap hari. Dianjurkan diminum sebelum tidur agar dapat dimonitor efek puncaknya di pagi hari esoknya. Lamanya terapi sangat tergantung pada kasusnya. Secara umum, terapi anti koagulan harus dilanjutkan sampai bahaya terjadinya emboli dan trombosis sudah tidak ada. Pemeriksaan waktu protrombin baru dilakukan setiap hari begitu dimulai dosis inisial sampai tercapainya waktu protrombin yang stabil di batas terapeutik. Setelah tercapai, interval pemeriksaan waktu protrombin tergantung pada penilaian dokter dan respon penderita terhadap obat. Interval yang dianjurkan adalah 1-4 minggu.³

II.1.C. Manfaat Warfarin

Hemostasis adalah penghentian kehilangan darah dari pembuluh darah yang cedera. Trombosit pertama melekat pada makromolekul di *region subendotelial* dari pembuluh darah yang yang cedera kemudian beragregasi untuk membentuk plak hemostatis primer. Trombosit merangsang aktivasi lokal darifaktor koagulasi plasma, memicu pembentukan bekuan fibrin yang mendukung agagregasitrombosit. Kemudian seiring penyembuhan luka, agregasi trombosit dan bekuan fibrin didegradasi.^{6,7,8.}

Dalam garis besar proses pembekuan darah berjalan melalui tiga tahap :

1. aktivasi tromboplastin,
2. pembentukan trombin dari protrombin, dan
3. pembentukan fibrin dari fibrinogen.

Secara *in vitro* aktivasi tromboplastin, yang akan mengubah protrombin (faktor II) menjadi trombin (faktor IIa) terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu mekanisme ekstrinsik dan intrinsik. Pada mekanisme ekstrinsik, tromboplastin jaringan (faktor III, berasal dari jaringan yang rusak) akan bereaksi dengan faktor VIIa yang dengan adanya kalsium (faktor IV) akan mengaktifkan faktor X. Faktor Xa bersama faktor Va, ion kalsium dan fosfolipidtrombosit akan mengubah protrombin menjadi trombin. Oleh pengaruh trombin, fibrinogen (faktor I) akan diubah menjadi fibrin monomer (faktor Ia) yang tidak stabil. Fibrinmonomer, atas pengaruh faktor VIIIa akan menjadi stabil dan resisten terhadap enzim proteolitik misalnya plasmin.^{9,10,11.}

Pada mekanisme intrinsik, semua faktor yang diperlukan untuk pembekuan darah berada di dalam darah. Pembekuan dimulai bila faktor Hageman (faktor XII) kontak dengan suatu permukaan yang bermuatan negatif, misalnya kolagen subendotel pembuluh darah yang rusak. Reaksi tersebut

dipercepat dengan pembentukan kompleks antara faktor XII, faktor Fitzgerald dan prekalkrein. Faktor XIIa selanjutnya akan mengaktivasi faktor XI, dan faktor XIa bersama ion kalsium akan mengaktivasi faktor IX. Faktor IX aktif, bersama-sama faktor VIII, ion kalsium dan fosfolipid akan mengaktifkan faktor X.¹²

Proses pembekuan darah akan dihentikan oleh sistem anti koagulan dan fibrinolitik di dalam tubuh. Faktor-faktor yang menghentikan proses pembekuan darah adalah :

1. Larutnya faktor pembekuan darah dalam darah yang mengalir.¹²
2. Metabolisme bentuk aktif faktor pembekuan darah oleh hati.¹²
3. Mekanisme umpan balik di mana trombin menghambat aktifitas faktor V dan VIII.¹²
4. Adanya mekanisme anti koagulasi alami terutama oleh antitrombin III, protein C dan S.¹²

II.2. Klasifikasi hati dan otak

II.2.A. Hati

II.2.A.1. Anatomi hati

Hati merupakan organ *abdomen* yang paling besar dan kelenjar terbesar dalam tubuh dengan berat sekitar 1,5 kg serta membentuk seperlima puluh berat badan dewasa total. Ia relatif lebih besar pada masa bayi, yang membentuk seperdelapan belas berat lahir. Organ ini dibungkus terletak pada kuadran kanan atas dan menempati paling luas pada *region hiperkondrium* kanan kemudian meluas ke *hipocondrium* kiri dan *region epigastrika*. Hati memiliki permukaan *superior* yang cembung dan terletak di bawah kubah kanan diafragma dan sebagian kubah kiri. Bagian bawah hati berbentuk cekung dan merupakan atap dari ginjal kanan, lambung, pankreas dan usus.^{16,17}

MORFOLOGI

Secara keseluruhan, hati dibagi menjadi 8 segmen. Permukaan *posterolateral* kanan terdiri atas segmen VI di bagian *anterior* dan segmen VII di bagian *posterior*. Permukaan *anterolateral* kanan terdiri atas segmen V di *anterior* dan segmen VIII di *posterior*. Permukaan *anterior* kiri dibagi oleh *fissura umbilicalis* ke dalam segmen IV di bagian *anterior* dari *lobus* kiri. Permukaan *posterior* adalah segmen II. Segmen I terletak di bagian dorsal, yang memiliki vaskularisasi bebas dari *porta hepatis* dan 3 vena *hepatis* utama.¹⁶

II.2.A.2. Fisiologi hati

Fungsi dasar hati dapat dibagi menjadi (1) fungsi untuk menyimpan dan menyaring darah, (2) fungsi metabolisme yang berhubungan dengan sebagian besar sistem metabolisme tubuh, dan (3) fungsi sekresi yang berperan membentuk empedu yang mengalir melalui saluran empedu ke saluran pencernaan. Dalam fungsi vaskularnya hati adalah sebuah tempat mengalir darah yang besar. Hati juga dapat dijadikan tempat penyimpanan sejumlah besar darah. Aliran limfe dari hati juga sangat tinggi karena pori dalam sinusoid hati sangat permeable. Selain itu di hati juga terdapat sel *Kupffer* (derivat sistem *retikuloendotelial* atau *monosit makrofag*) yang berfungsi untuk menyaring darah.¹⁸

II.2.A.3. Mikroskopis hati

Hati dibungkus oleh simpai yg tebal, terdiri dari serabut *kolagen* dan jaringan elastis yang disebut kapsul *Glisson*. Simpai ini akan masuk ke dalam *parenchym* hepar mengikuti pembuluh darah getah bening dan duktus *biliaris*.³⁶ Massa dari hati seperti *spons* yg terdiri dari sel-sel yg disusun di dalam lempengan-lempengan dimana akan masuk ke dalamnya sistem pembuluh kapiler yang disebut sinusoid. Sinusoid-sinusoid tersebut berbeda dengan kapiler-kapiler di bagian tubuh yang lain, oleh karena lapisan endotel yang meliputinya terdiri dari sel-sel *fagosit* yg disebut sel *kupfer*. Sel *kupfer* lebih permeabel yang artinya mudah dilalui oleh sel-sel *makro* dibandingkan kapiler-kapiler yang lain. Lempengan sel-sel hepar tersebut tebalnya 1 sel dan punya hubungan erat dengan

sinusoid. Pada pemantauan selanjutnya nampak parenkim tersusun dalam *lobuli-lobuli*. Pada tengah-tengah *lobuli* terdapat 1 vena sentralis yang merupakan cabang dari vena-vena *hepatika* (vena yang menyalurkan darah keluar dari hepar). Di bagian tepi di antara *lobuli-lobuli* terhadap tumpukan jaringan ikat yang disebut traktus *portalis* yaitu traktus yang mengandung cabang-cabang *v.porta*, *A.hepatika*, *ductus biliaris*. Cabang dari vena *porta* dan arteri *hepatika* akan mengeluarkan isinya langsung ke dalam sinusoid setelah banyak percabangan. Sistem bilier dimulai dari *canaliculi biliaris* yang halus yg terletak di antara sel-sel hepar dan bahkan turut membentuk dinding sel. *Canaliculi* akan mengeluarkan isinya ke dalam *intrahepatularis*, dibawa ke dalam empedu yg lebih besar, air keluar dari saluran empedu menuju kandung empedu.^{29,30}

Dari setiap tikus dibuat dua sampai tiga preparat jaringan hati dan tiap preparat dibaca 5 lapangan pandang dengan perbesaran 100x dan 400x. Penilaian terhadap gambaran mikroskopis dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Kriteria penilaian perdarahan hati

Tingkat Perubahan	Nilai
Normal	0
Degenerasi Hidropik	1
Nekrosis	2
Perdarahan	3

II.2.A.4. Patologi hati akibat Warfarin

Kerusakan hepar akibat penggunaan warfarin jarang terjadi, tetapi *acute liver injury* akibat penggunaan warfarin telah dilaporkan. Kerusakan hepar lebih sering muncul pada penggunaan derivat *coumarin*, seperti *phenprocoumon* dan *cenocoumaro* yang tersedia di negara lain, tetapi tidak di Amerika Serikat. Kasus yang sering terjadi pada *acute liver injury* mulai muncul pada 3 minggu hingga 8 minggu setelah mulai mengkonsumsi warfarin. Meskipun jarang, kerusakan hepar

setelah penggunaan berbulan-bulan maupun bertahun-tahun telah dilaporkan (biasanya berhubungan dengan *phenprocoumon hepatotoksisitas*). Peningkatan enzim-enzim hati berkaitan dengan terjadinya *kolestasis*. *Eosinofilia* dapat muncul, tetapi manifestasi *immunoalergic* lainnya tidak ditemukan, demikian juga autoantibodi. Masa penyembuhan dapat memanjang, terutama jika terdapat *kolestatis*. Rekurensi akibat pemaparan ulang dapat terjadi dan bahkan menjadi lebih berat dan dapat menyebabkan kematian. Overdosis akibat warfarin dapat menyebabkan perdarahan hebat dan kegagalan fungsi hati. Selain itu, terapi warfarin jangka panjang dapat menimbulkan rupture hepar dan perdarahan intraperitoneal yang mengancam jiwa.¹⁹

II.2.B. Otak

II.2.B.1. Anatomi otak

1. *Cerebrum* (Otak Besar)

Cerebrum secara terbagi menjadi 4 (empat) bagian yang disebut *Lobus*. Bagian *lobus* yang menonjol disebut *gyrus* dan bagian lekukan yang menyerupai parit disebut *sulcus*. Keempat *Lobus* tersebut masing-masing adalah: *Lobus Frontal*, *Lobus Parietal*, *Lobus Occipital* dan *Lobus Temporal*.²²

2. *Cerebellum* (Otak Kecil)

Otak Kecil atau *Cerebellum* terletak di bagian belakang kepala, dekat dengan ujung leher bagian atas. *Cerebellum* mengontrol banyak fungsi otomatis otak, diantaranya: mengatur sikap atau posisi tubuh, mengontrol keseimbangan, koordinasi otot dan gerakan tubuh. Otak kecil juga menyimpan dan melaksanakan serangkaian gerakan otomatis yang dipelajari seperti gerakan mengendarai mobil, gerakan tangan saat menulis, gerakan mengunci pintu dan sebagainya.^{22,23}

3. *Brainstem* (Batang Otak)

Batang Otak terdiri dari tiga bagian, yaitu:

* *Mesencephalon* atau Otak Tengah (disebut juga *Mid Brain*) adalah bagian teratas dari batang otak yang menghubungkan Otak Besar dan Otak Kecil.²⁴

* *Medulla oblongata* adalah titik awal saraf tulang belakang dari sebelah kiri badan menuju bagian kanan badan, begitu juga sebaliknya. *Medulla* mengontrol fungsi otomatis otak, seperti detak jantung, sirkulasi darah, pernafasan, dan pencernaan.²⁴

* *Pons* merupakan stasiun pemancar yang mengirimkan data ke pusat otak bersama dengan formasi reticular. Pons yang menentukan apakah kita terjaga atau tertidur.²⁴

4. *Limbic System* (Sistem Limbik)

Sistem limbik terletak di bagian tengah otak, membungkus batang otak ibarat kerah baju. Limbik berasal dari bahasa latin yang berarti kerah. Bagian otak ini sama dimiliki juga oleh hewan mamalia sehingga sering disebut dengan otak mamalia. Komponen limbik antara lain *hipotalamus*, *thalamus*, *amigdala*, *hipocampus* dan *cortex lymbik*. Sistem limbik berfungsi menghasilkan perasaan, mengatur produksi hormon, memelihara homeostasis, rasa haus, rasa lapar, dorongan seks, pusat rasa senang,metabolisme, dan juga memori jangka panjang.²⁵

II.2.B.2. Fisiologi otak

1. *Lobus oksipitalis*, untuk pengelolaan awal masukan penglihatan.^{20,21}
2. *Lobus Temporalis*, untuk sensasi suara (Pendengaran).^{20,21}
3. *Lobus parietalis*, untuk menerima & mengolah masukan sensorik seperti sentuhan, panas, tekanan, dingin dan nyeri dari permukaan tubuh.^{20,21}
4. *Lobus Frontalis*, berfungsi untuk aktifitas motorik volunteer, kemampuan berbicara, elaborasi pikiran.^{21,21}

II.2.B.3. Mikroskopis Otak

BAGIAN-BAGIAN SEL SYARAF

1. Neuron.²⁷

Unit fungsional

- Ada ± 10 miliar neuron dalam tubuh manusia.²⁷
- Kemampuan khusus.²⁷
 - Irritabilitas yaitu kemampuan untuk merespon stimulus.²⁷
 - Propagasi impuls yaitu kemampuan untuk meneruskan impuls.²⁷

Setiap neuron memiliki 3 segmen

- Segmen reseptif → dendrit dan *perikarion*.²⁷
- Segmen konduktif → axon.²⁷
- Segmen transmisi → sinapsis.²⁷
- Komponen utama:
 - Perikarion/ badan sel/ soma.²⁷
 - Sitoplasma
 - *Badan nissl*
 - Dendrit
 - Processus.²⁷
 - Axon dan dendrit

Dari setiap tikus dibuat dua sampai tiga preparat jaringan otak dan tiap preparat dibaca 5 lapangan pandang dengan perbesaran 100x dan 400x.

Penilaian terhadap gambaran mikroskopis dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Kriteria penilaian perdarahan otak

Tingkat Perdarahan	Skor
Tidak terjadi perdarahan	0
Perdarahan dinding <25%	1
Perdarahan dinding 25%-50%	2
Perdarahan dinding 51%-75%	3

Perdarahan dinding 76%-100%	4
-----------------------------	---

II.2.B.4 Patologi Otak akibat Warfarin

Pendarahan adalah efek samping utama dari toksisitas warfarin dan superwarfarin dan berhubungan dengan intensitas antikoagulasi, lamanya terapi, keadaan klinis yang mendasari pasien, dan penggunaan obat-obatan lain yang dapat mempengaruhi hemostasis atau mengganggu metabolisme warfarin. Perdarahan fatal atau non-fatal dapat terjadi dari setiap jaringan atau organ. Komplikasi perdarahan utama meliputi perdarahan intrakranial. Pendarahan besar biasanya melibatkan saluran pencernaan tetapi mungkin melibatkan sumsum tulang belakang atau otak, perikardial, paru, adrenal, atau situs hati.²⁶

II.3. Uji Toksisitas

II.3.A. Definisi

Uji toksisitas merupakan pengujian yang dirancang untuk mengevaluasi keseluruhan efek umum suatu senyawa pada hewan coba. Tipe uji toksisitas terbagi menjadi dua, yaitu uji toksisitas umum dan uji toksisitas khusus. Uji toksisitas umum terbagi lagi menjadi tiga, yaitu uji toksisitas akut, uji toksisitas jangka pendek (subakut/ subkronik), dan uji toksisitas jangka panjang. Sedangkan uji toksisitas khusus mencakup uji karsinogenesis, mutagenesis, teratogenesis, dan imunotoksikologi.^{4,13}

II.3.B. Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut merupakan uji yang dilakukan untuk mengukur efek samping yang terjadi dalam waktu yang pendek (hingga 14 hari) setelah pemberiandosis tunggal (atau pajanan terhadap konsentrasi) dari tes substansi atau setelah dosisberulang (pajanan berulang), biasanya dalam 24 jam dari titik awal.¹³

Tujuannya untuk menentukan potensi toksisitas dari senyawa kimia pada manusia dan bentuk hidup lainnya agar aman untuk digunakan. Uji toksisitas akut juga berfungsi untuk menentukan efek samping yang terjadi dalam jangka pendek

setelah pemberian dosis tunggal pada tes substansi. Uji toksisitas akut penting untuk menilai risiko yang ditimbulkan substansi kimia baru dan untuk kontrol yang lebih baik dari agen natural dan sintetis pada lingkungan manusia. Selain itu juga, bertujuan untuk identifikasi dosis letal atau pajanan yang membunuh organisme setelah pajanan pendek atau dosis tunggal.¹³

Tolok ukur yang paling sering digunakan dalam mengukur toksisitas akut adalah dosis letal median (LD₅₀). LD₅₀ didefinisikan sebagai dosis tunggal suatu zat yang akan membunuh 50% hewan coba. Pengujian ini juga dapat menunjukkan organ sasaran yang mungkin dirusak dan efek toksik spesifiknya. Nilai LD₅₀ berguna untuk hal-hal sebagai berikut :

- a. Memberikan informasi tentang mekanisme toksisitas, pengaruh umur, jenis kelamin, faktor pejamu, dan faktor lingkungan lainnya serta variasi respons antarspesies suatu populasi hewan.¹³
- b. Memberi informasi yang dibutuhkan dalam merencanakan pengujian obat pada manusia dan dalam pengendalian mutu zat kimia, deteksi pencemaran toksik serta perubahan fisik yang mempengaruhi bioavailabilitas.¹³
- c. Klasifikasi zat kimia sesuai dengan toksisitas relatifnya. Klasifikasi lazim yang digunakan adalah:

Tabel.3. Klasifikasi kategori toksik³⁵

LD ₅₀ (mg/kgBB)	Kategori
<5	Supertoksik
5 – 50	Amat sangat toksik
50 – 500	Sangat toksik
500 – 5000	Toksik sedang
5000 – 15000	Toksik ringan
>15000	Praktis tidak toksik

Secara umum, semakin besar nilai LD₅₀, semakin rendah tingkat toksisitas suatu senyawa. Begitupun sebaliknya, semakin kecil nilai LD₅₀, semakin toksik senyawa tersebut.¹³

- d. Evaluasi dampak keracunan yang tidak disengaja, perencanaan penelitian toksisitas subakut dan kronik pada hewan.¹³
- e. Menentukan indeks terapeutik yaitu rasio antara dosis letal dan dosis efektif pada spesies dan strain yang sama.¹³

Walaupun toksisitas merupakan sifat bawaan suatu zat, bentuk dan tingkat manifestasi toksiknya pada suatu organisme bergantung pada berbagai jenis faktor. Beberapa faktor tersebut adalah :

- a. Spesies, strain, dan individu

Telah lama diketahui adanya perbedaan efek toksik antara satu spesies dengan spesies lain. Walaupun demikian, diantara mamalia pun terdapat perbedaan yang menonjol dalam toksisitas. Hal ini disebabkan oleh perbedaan mekanisme detoksifikasi.¹³

- b. Perbedaan jenis kelamin

Hewan jantan dan betina dari strain dan spesies yang sama biasanya bereaksi terhadap toksikan dengan cara yang sama pula. Namun, terdapat perbedaan kuantitatif menonjol dalam kerentanan mereka, terutama tikus.¹³

- c. Umur

Pada sebagian besar toksikan, organisme muda lebih rentan 1,5-10 kali daripada yang dewasa. Lebih rentannya hewan muda terhadap banyak toksikan disebabkan oleh defisiensi berbagai sistem detoksifikasi.¹³

- d. Rute pemberian

Nilai LD_{50} dipengaruhi pula oleh rute pemberian. Nilai terkecil didapatkan dengan rute intravena dan meningkat berturut-turut dengan rute pemberian intraperitoneal, subkutaneus, dan peroral.¹³

- e. Faktor lingkungan

Terdapat beberapa faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi toksisitas antara lain pengandangan hewan, pola siang dan malam, suhu, dan

kelembaban relatif. Walaupun demikian, nilai LD₅₀ untuk kebanyakan bahan kimia hanya sedikit dipengaruhi oleh faktor ini.¹³

f. Kesehatan hewan

Status kesehatan hewan dapat memberikan respon yang berbeda terhadap suatu toksikan. Hewan yang lemah lebih rentan terhadap racun dan obat karena resistensi umum dan mekanisme detoksifikasinya terganggu. Misalnya, penyakit hepar atau ginjal dapat meningkatkan kerentanan terhadap racun.¹³

II.3.C. Uji Toksisitas Subakut

Uji toksisitas subakut atau subkronik dilakukan dengan memberikan dosis berulang selama jangka waktu kurang lebih 10% dari masa hidup hewan.⁴

Studi oral selama 28 atau 90 hari pada tikus atau anjing merupakan ciri khas dari uji ini. Uji subkronis juga digunakan untuk memberikan informasi mengenai target organ dan potensi terjadinya akumulasi senyawa kimia pada organisme.⁴

II.3.D. Uji Toksisitas Kronik

Dilakukan pada sebagian besar masa hidup hewan uji:

- Durasi 2 - 7 tahun bergantung pada spesies.⁹
- Spesies dipilih dari hasil uji subkronis sebelumnya, studi farmakodinamik atas beberapa spesies hewan, mungkin dapat juga pada manusia dengan dosis tunggal yang memungkinkan sebagai uji coba, jika tidak digunakan dua spesies.⁹
- Minimum dua peringkat dosis.⁹
- Jalur pemberian jalur penggunaan dimaksud.⁹
- Evaluasi:

- 1.Seluruh hewan ditimbang seminggu sekali.⁹
2. Pemeriksaan badan lengkap seminggu sekali.⁹
- 3.Uji kimia darah, analisis urin, pemeriksaan hematologi dan uji fungsi atas seluruh hewan pada interval 3 sampai 6 bulan dan atas seluruh hewan yang abnormal.⁹

II.4. Hewan Coba

II.4.A. Definisi

Hewan coba atau hewan laboratorium adalah hewan yang khusus diternakkan untuk keperluan penelitian farmakologi. Hewan laboratorium digunakan sebagai model penelitian pengaruh bahan kimia atau obat pada manusia. Hewan coba yang lazim digunakan dalam uji toksisitas akut adalah tikus, mencit, marmut, kelinci, dan anjing.¹⁴

II.4.B. Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba yang akan digunakan harus diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7-14 hari. Karantina ini bertujuan agar hewan coba beradaptasi dengan suasana laboratorium dan menghilangkan stres akibat transportasi dan lingkungan yang berbeda. Temperatur dan kelembaban juga harus diperhatikan.¹⁴

Temperatur dijaga pada suhu kamar (18-26⁰C) dan kelembaban antara 40-70%.¹⁴

II.4.C. Cara Perlakuan Pada Hewan Coba

Secara umum toksikan harus diberikan melalui jalur yang biasa digunakan oleh manusia. Jalur melalui oral paling sering digunakan. Ada beberapa cara yang dapat dilakukan bila akan diberikan per oral, salah satunya dengan menggunakan sonde.¹⁵

II.4.D. Pengamatan

Sebelum diberikan perlakuan, pengamatan dimulai dari berat badan dan tingkah laku hewan coba. Setelah diberikan suatu zat aktif, hewan diobservasi sesuai dengan jenis toksisitas yang akan diteliti. Jangka waktu yang digunakan bervariasi.¹⁵

Perubahan berat badan, gejala toksisitas hingga kematian harus dilaporkan dalam penelitian. Pada toksisitas akut, pengamatan dilakukan selama 7-14 hari^{14,15}

Pengamatan dilanjutkan dengan pemeriksaan organ secara makroskopis maupun mikroskopis dengan pemeriksaan histopatologi. Berdasarkan hasil tersebut dapat dilihat kerusakan pada organ-organ hewan coba.^{14,15}

II.5. Tikus (*Rattusnorvegicus*)



Gambar.4. *Rattusnorvegicus* galur Wistar

Sebuah galur atau strain, mengacu pada tikus, adalah sebuah kelompok di mana semua anggota secara genetik identik. Pada tikus, ini dicapai melalui perkawinan sedarah. Dengan memiliki populasi jenis ini, adalah mungkin untuk melakukan percobaan pada peran gen, atau melakukan percobaan yang

mengecualikan variasi dalam genetika sebagai faktor. Sebaliknya, outbred strain, digunakan ketika identik genotipe tidak diperlukan atau populasi acak diperlukan, dan lebih didefinisikan sebagai leluhur pembanding strain.^{14,15}

“*Wistar Rat*” adalah tikus Wistar strain outbred tikus albino milik spesies *Rattus norvegicus*. Jenis galur ini dikembangkan di Institut Wistar pada tahun 1906 untuk digunakan dalam biologi dan penelitian medis, dan adalah terutama galur tikus pertama dikembangkan sebagai model organisme pada saat laboratorium terutama menggunakan *Mus musculus* (mencit), atau mencit rumah. Lebih dari separuh dari semua strain tikus laboratorium adalah keturunan dari koloni asli yang dikembangkan oleh Henry fisiologi Donaldson, J. Milton administrator ilmiah Greenman, dan peneliti genetik / embriologi Helen Dean King.^{14,15}

Hewan ini secara umum dianggap sebagai hewan sosial namun mungkin juga hidup soliter. *Rattus norvegicus* memiliki kemampuan adaptasi yang hebat dan mampu bertahan hidup pada variasi habitat yang luas di lingkungan alami, walaupun mereka lebih memilih hidup di liang. Tikus merupakan hewan nokturnal dan secara umum memiliki tiga periode aktivitas, pertama saat diawal, kedua saat ditengah, dan terakhir saat diakhir periode malam. Tikus makan selama periode aktivitas tiga hingga lima kali.^{14,15}

Tikus Norway cukup besar, kuat, berwarna keabu-abuan atau kecoklatan dengan bulu yang kasar dan panjang, berambut jarang dan ekor bersisik. Ekornya lebih pendek dari kombinasi panjang kepala dan badan (sekitar 80%). Hal ini merupakan kunci karakter identifikasi dalam membedakan spesies ini dengan tikus hitam (*Rattus rattus*). Bagian bawah dan kaki berwarna keabu-abuan hingga keputihan.^{14,15}

Penggunaan tikus untuk penelitian di laboratorium dimulai pada akhir abad ke-19. Pembiakan yang lebih sistematis dimulai pada abad ke-20 dan

menghasilkan tikus strain Wistar, Spague-Dawley, dan Long-Evans hooded. Kebanyakan strain tikus laboratorium adalah albino.^{14,15}

Suhu tubuh pada siang hari 35,6-36⁰ C dan meningkat pada malam hari menjadi 37,8-38⁰ C. Rata-rata lama hidup tikus laboratorium bervariasi antara 2-4 tahun tergantung dari strain, jenis kelamin, diet, dan kondisi hidupnya. Tikus mencapai kematangan seksual rata-rata pada usia 2-3 bulan. Seperti hewan pengerat lainnya, tikus dapat berkembang biak sepanjang tahun.^{14,15}

Kematangan seksual didapatkan pada usia 30-50 hari. Pada tikus betina, rata-rata pada usia 38 hari sudah terjadi pubertas dan VO (Vaginal Opening). Estrus pertama pada usia 38 hari.³⁴ Siklus estrus terjadi dalam 3 tahap; *proestrus*, *estrus*, *diestrus*. Tikus betina bersifat *continuously polyestrus* (berlangsung secara konstan).³⁵ Tikus betina dapat mencapai berat maksimum 400 gram dan tikus jantan 800 gram, walaupun berat badan dapat bervariasi dengan strain. Fitur fisiologi mayor dari sistem pencernaan tikus adalah lambung yang terdapat region nonglandular dan glandular, sekum yang terbentuk relatif baik dan absennya kandung empedu.^{14,15}

II.5.A. Klasifikasi *Rattus norvegicus*

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: norvegicus