

MENCIT SEBAGAI MODEL HEWAN PERCOBAAN PADA UJI PIROGEN

¹IDA LESTARI SOEDIJAR, ²ELI NUGRAHA, ²DYAH WIDYARIMBI,
²SRI WERDININGSIH, ³BUDI RACHMAN

¹*Sekretaris Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan hewan*

²*Unit Uji Farmasetik dan Premiks*

³*Unit Uji Hewan Percobaan dan Limbah*

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur-Bogor, 16340

ABSTRAK

Uji Pirogen merupakan salah satu persyaratan minimum kelulusan untuk sediaan obat hewan dalam bentuk injeksi. Selain itu, sediaan injeksi obat hewan ini, harus melalui uji potensi, uji toksisitas dan uji umum lain untuk dinyatakan memenuhi persyaratan minimum berdasarkan FOHI (Farmakope Obat Hewan Indonesia) Jilid II (Sediaan Farmasetik dan Premiks) Edisi 4, Tahun 2009. Dalam uji pirogen ini, disyaratkan menggunakan kelinci sebagai hewan percobaan, akan tetapi selain ketersediaannya sering menjadi kendala, juga diperlukan perlakuan karantina paling tidak 2 minggu sebelum pengujian untuk menjamin hewan ini bebas dari cacingan, diare, penyakit kulit, dan layak digunakan. Mencit (*mice*) strain DDY (*Deutschland, Denken and Yoken*) merupakan strain mencit yang bisa menjadi pengganti kelinci pada uji pirogen, yang mana BBPMSOH memproduksinya dalam skala rutin dan jumlah banyak serta telah terbukti kemurnian dan kepekaannya untuk pengujian obat hewan. Pengujian pirogen ini merupakan metode modifikasi dari metode yang tercantum di dalam FOHI, yaitu menggunakan mencit DDY sebanyak 5 ekor sebagai hewan percobaan dan alat pengukur suhu berupa *talking thermometer*, dengan mengukur suhu pada dahi atau lubang telinga.

Kata kunci: uji pirogen, sediaan injeksi, mencit DDY, *talking thermometer*.

ABSTRACT

Pyrogen test is one of the minimum requirements for veterinary drugs as an injection preparation. According to FOHI (Pharmacopoeia of the Indonesian Veterinary Medicine) Part II (Pharmaceutical and Premix Preparations) 4th edition, 2009, the injection preparation must be met the minimum requirements for potency and toxicity tests and other general tests. FOHI recommends to use rabbits as experimental animals, but its availability is often a constraint, and require at least 2 weeks prior to testing to ensure the animal is free from worms, diarrhea, skin diseases, and to guarantee be used as experimental animals. Mice DDY (Deutschland, Denken and Yoken) strain could be a substitute for the rabbits in pyrogen test since NVDAL (BBPMSOH) provides them in large quantities regularly, also they have been proven in purity and sensitive for testing. This pyrogen test is a modification method listed in FOHI using 5 DDY mice as the experimental animal and talking thermometer to measure mice's body temperature on forehead or inserted into ear holes.

Keywords: *pyrogen test, injection preparation, DDY mice, talking thermometer*

PENDAHULUAN

Sediaan injeksi adalah larutan steril, emulsi atau suspensi yang menurut FOHI harus diuji efektivitas (potensi/kadar), keseragaman unit dosis, keseragaman isi dan bobot, serta uji bakteri endotoksin-pirogen (pirogenitas) dan uji sterilitas. Pirogen atau endotoksin bakteri adalah produk metabolit dari pertumbuhan mikroba, larut air, tahan panas, lipopolisakarida (LPS) nya tidak dapat dihancurkan dengan sterilisasi uap air/penyaringan ⁽²⁾.

Pirogen adalah produk metabolisme mikroorganisme umumnya berasal dari bakteri, kapang serta virus, yang terdiri dari lemak yang berhubungan dengan suatu molekul pembawa n polisakarida dan peptida. Pirogen eksogen yang berasal dari luar tubuh apabila diinjeksikan kedalam tubuh manusia atau hewan dapat menyebabkan kenaikan suhu tubuh ^(1,3).

Pirogen dapat masuk ke dalam suatu sediaan dalam bentuk mikroorganisme hidup atau mati. Air/larutan/sediaan injeksi yang mengandung pirogen yang digunakan pada proses pembuatan dapat menjadi sumber kontaminasi. Apabila pirogen masuk ke dalam tubuh akan menjadi benda asing dan sesuai dengan teori kekebalan akan terjadi respon imun antara lain berupa demam. Proses terjadinya demam dimulai dari terpaparnya tubuh manusia atau hewan terhadap pirogen (benda asing) sehingga menstimulasi tubuh untuk melindungi tubuh dengan cara membentuk kekebalan melawan benda asing (pirogen).

Pirogen akan sangat berbahaya bila cairan injeksi dalam jumlah besar, misalnya bila pirogen ini dalam larutan infus yang diberi secara intra vena, karena tidak saja menyebabkan kenaikan suhu / demam tetapi dapat berakibat fatal / kematian.

Pada uji pirogen dengan menggunakan mencit disini diharapkan dapat membantu kelengkapan uji yang dipersyaratkan FOHI untuk sediaan injeksi mengingat mencit memiliki kelebihan sebagai hewan percobaan untuk uji ini dibandingkan bila menggunakan kelinci sebagai hewan percobaan.

MATERI DAN METODE

Bahan dan alat

Mencit umur 10 minggu tanpa memandang jenis kelamin (jantan/betina) sebanyak 5 (lima) ekor. *Talking thermometer* dengan ketelitian skala $0,1^{\circ}\text{C}$, yang langsung dapat digunakan untuk mengukur suhu tubuh bila disentuh kedahi mencit. Injektor 1 mL dari bahan gelas yang tahan pemanasan suhu 250°C serta *disposable syringe* 1 mL. Sediaan uji berupa larutan NaCl fisiologis steril dan sediaan antibiotik (*oxytetracycline*) yang akan diuji pirogenitasnya.

Metode

Dilakukan penyuntikan pada 5 ekor mencit umur 10 minggu dengan larutan NaCl fisiologis sebanyak 0,2 mL/ekor secara intra vena. Mencit tadi diukur temperaturnya pada dahi atau melalui lubang telinganya 90 menit sebelum penyuntikan dan tiap 30 menit setelah penyuntikan sebanyak 6 kali (total lamanya pengukuran suhu tubuh mencit via lubang telinga adalah 3 jam setelah penyuntikan larutan NaCl fisiologis).

Mencit-mencit tadi dipuasakan semalam dan keesokan harinya disuntikkan sebanyak 0,2 mL/ekor secara intra vena dengan larutan antibiotik oksitetrasiklin (sediaan yang akan diuji pirogenitasnya) yang sebelumnya telah dihangatkan di dalam *waterbath* pada suhu 38,5°C.

Pada masing-masing mencit disuntik secara perlahan-lahan ke dalam vena lateralis pada ekor dimana waktu injeksi tidak boleh lebih dari 4 menit.

Mencit-mencit ini juga diukur suhunya 90 menit sebelum penyuntikan antibiotik oksitetrasiklin dan tiap 30 menit setelah penyuntikan sebanyak 6 kali (total lamanya pengukuran suhu tubuh mencit via lubang telinga adalah 3 jam setelah penyuntikan larutan antibiotik oksitetrasiklin yang diuji).

Perbedaan suhu ruangan terhadap suhu pemeliharaan tidak boleh lebih dari 3°C (kandang/cage mencit) ditaruh didalam ruangan selama semalam sampai pengujian selesai, mencit-mencit tersebut-tidak diberi makan dan minum ⁽²⁾.

Pencatatan suhu badan mencit dengan interval tidak lebih dari 30 menit dimulai 90 menit sebelum injeksi sampai 3 jam sesudah injeksi.

Mencit yang digunakan dalam pengujian ini tidak boleh menunjukkan perbedaan suhu lebih besar dari 0,6°C antara mencit yang satu dibandingkan dengan mencit lainnya, karena uji akan dianggap tidak valid ⁽²⁾.

Penafsiran Hasil

Suhu awal masing-masing mencit adalah suhu rata-rata dengan interval 30 menit dan dilakukan 90 menit sebelum diinjeksi dengan sediaan uji.

Suhu maksimum adalah suhu tertinggi yang dicatat selama 3 jam setelah injeksi sediaan uji. Pencatatan suhu badan mencit dengan interval tidak lebih dari 30 menit dimulai 90 menit sebelum injeksi sampai 3 jam setelah injeksi sediaan uji.

Selisih antara suhu awal dan suhu maksimum tiap mencit dinyatakan sebagai suhu respon. Jika suhu respon negatif, dianggap nol.

Mencit dinyatakan memenuhi syarat jika perbedaan suhu awal antara mencit 1 dengan yang lain tidak lebih dari 1°C .

Sediaan uji dinyatakan memenuhi syarat (MS) jika jumlah respon tidak melebihi kolom 2 dan dinyatakan tidak memenuhi syarat (TMS), jika jumlah respon melebihi kolom 3 untuk tiap kelompok.

Jika jumlah respon terletak antara kolom 2 dan kolom 3, ulangi pengujian.

Tabel 1. Standard suhu tubuh hewan percobaan pada uji pirogenitas sesuai FOHI 2009.

(Jumlah) Mencit	Sediaan uji MS jika jumlah respon tidak melebihi	Sediaan uji TMS bila jumlah respon melebihi
3	1,20°C	2,70°C
6	2,80°C	4,30°C
9	4,50°C	6,00°C
12	6,60°C	8,10°C

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mencit (*mice*) strain DDY (*Deutschland, Denken and Yoken*) merupakan strain mencit yang dikembangkan di laboratorium BBPMSOH sejak tahun 1985, dimana strain mencit ini terkenal sangat bagus, baik dalam hal reproduksinya maupun pertumbuhannya yang superior. Di Jepang, strain mencit ini sudah banyak dipakai dalam pengujian efikasi obat dan berbagai penelitian yang menyangkut pharmacological, pharmacokinetic, and toxicology ⁽⁴⁾.

Dari hasil pengujian terlihat bahwa mencit-mencit yang digunakan sebagai model hewan percobaan uji pirogen dapat dinyatakan memenuhi syarat dan dapat dilanjutkan ke uji pirogen mengingat mencit-mencit tersebut memenuhi syarat karena perbedaan suhu awal antara mencit satu dengan yang lain tidak lebih dari 1°C, seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2: Suhu tubuh mencit setelah penyuntikan NaCl fisiologis 0.2 mL/ekor secara intra vena

Jam	Tikus 1 (jantan) (60 gr)	Tikus 2 (jantan) (55 gr)	Tikus 3 (jantan) (55 gr)	Tikus 4 (betina) (40 gr)	Tikus 5 (betina) (45 gr)
8.00	35.40°C	35.40°C	35.40°C	35.40°C	35.40°C
9.30	Suntik NaCl	Suntik NaCl	Suntik NaCl	Suntik NaCl	Suntik NaCl
10.00	35.10°C	35.10°C	35.20°C	35.50°C	35.50°C
10.30	34.40°C	34.40°C	34.40°C	34.80°C	34.90°C
11.00	34.60°C	35.00°C	34.80°C	34.50°C	35.30°C
11.30	34.60°C	34.60°C	34.90°C	34.90°C	34.60°C
12.00	34.80°C	34.60°C	34.70°C	34.60°C	34.70°C
12.30	35.00°C	34.70°C	35.40°C	35.00°C	35.30°C
Rata-rata	34.75°C	34.73°C	34.90°C	34.88°C	35.05°C

Pada Tabel 3 dapat dibaca bahwa respons mencit-mencit setelah penyuntikan sampel antibiotik oksitetrasiklin dapat dinyatakan memenuhi syarat uji pirogen mengingat hasil selisih antara suhu awal dan suhu maksimum tiap mencit atau suhu respon tidak melebihi 1°C (mencit pertama dan mencit kedua adalah 0,7°C, sedangkan mencit kelima 0,4°C, mencit keempat 0°C), walaupun mencit ketiga suhu responsnya 1,1°C akan tetapi tetap memenuhi kategori memenuhi syarat karena masih dibawah 1,2°C seperti pada kolom kedua.

Tabel 3: Suhu tubuh mencit setelah penyuntikan sediaan uji oksitetrasiklin (OTC) 0,2 mL per ekor.

Jam	Tikus 1 (jantan) (60 gr)	Tikus 2 (jantan) (55 gr)	Tikus 3 (jantan) (55 gr)	Tikus 4 (betina) (40 gr)	Tikus 5 (betina) (45 gr)
8.00	34.60°C	34.60°C	34.10°C	34.80°C	34.80°C
9.30	Suntik OTC	Suntik OTC	Suntik OTC	Suntik OTC	Suntik OTC

10.00	34.80°C	34.80°C	34.80°C	34.40°C	34.60°C
10.30	34.90°C	34.60°C	34.70°C	34.80°C	34.10°C
11.00	35.10°C	34.40°C	34.70°C	34.50°C	34.80°C
11.30	34.90°C	34.90°C	34.80°C	34.60°C	34.80°C
12.00	35.30°C	35.30°C	35.20°C	34.70°C	35.20°C
12.30	35.00°C	35.00°C	35.10°C	34.60°C	34.80°C
Rata-rata	35.00°C	34.83°C	34.88°C	34.60°C	34.72°C

KESIMPULAN

Dari hasil pengkajian ini dapat disimpulkan bahwa mencit dapat digunakan sebagai hewan percobaan sebagai alternatif atau pengganti kelinci pada pengujian pirogenitas untuk produk injeksi. *Talking thermometer* yang digunakan untuk mengukur suhu tubuh mencit mudah digunakan karena dilengkapi sensor sehingga dapat meningkatkan kecepatan dan akurasi pengukuran.

SARAN

Perlu dilakukan uji validasi bagi uji pirogen ini agar kedepan uji ini dapat dilakukan dengan lebih sempurna agar dapat melengkapi persyaratan FOHI bagi sediaan injeksi, mengingat uji ini masih bersifat uji percobaan awal.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Code Federal Regulation.** 1976. Chapter 21. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. 1976.
2. **Anonimous.** Farmakope Obat Hewan Indonesia, Jilid II, Sediaan Farmasetik dan Premiks, Edisi 4, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Departemen Pertanian RI.
3. **Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing.** 2012. Questions and Answers ; U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER); Center for Veterinary Medicine (CVM),

Center for Devices and Radiological Health (CDRH); Office of Regulatory Affairs (ORA),

4. **Laboratory Animal Resource Bank** at NIBIO, updated 2005-2013, Japan (larb@nibio.go.jp).