

Metode *In Vivo* pada Terapi Jus Lidah Buaya terhadap Luka Insisi *Pseudomonas aeruginosa*: Kajian Bioetika dan *Animal Welfare*

Angela M. Lusiastuti dan H. Pramudito
Pusat Riset Perikanan Budidaya

ABSTRACT

In Vivo Technique of Aloe vera Juice Therapy of Wound Infection by *Pseudomonas aeruginosa*: A Study On Bioethics and Animal Welfare. The essence of ethical problems in research is moral obligation that in accordance with respect onto living creatures, although the end/final aim of the research is for the human welfare. In this paper discussed the ethics implication of animal welfare of research which titled *In Vivo* Method in Aloe Vera Juice Therapy on Incision Wound of *Pseudomonas aeruginosa*. The ethics will explain the scientific research reflection about the responsibility and the boundary that researcher should do. The aim of this research is to know the *in vivo* comparability between aloe vera juice, sulfanilamide and oxytetracycline on longtime healing of infection wound of *Pseudomonas aeruginosa*. Experimental animals that we used are three months old female white rat (*Rattus norvegicus*) as many as 32 of them. Besides that, we used another 36 experimental animals to make a definite infection dose with making incision in musculus longissimus dorsi and infected by *P. aeruginosa*. The lowest concentration of infection dosages that cause 100% infection on the experimental animals was chosen for topical therapy trial. Four different treatments were tested in the therapy. *Aloe vera* juice was used in Treatment I; sulfanilamide in Treatment II; oxytetracycline in treatment III, and aquadest in Treatment IV as a control. The results showed that the *Aloe vera* juice gave the quickest longtime healing ($5,25 \pm 1,035$ days) than the the other treatments. During the research, five 'freedoms' were given to the experimental animals, i.e., freedom from hunger and thirst; freedom from discomfort; freedom from pain, injury and disease; freedom to express normal behaviour, and freedom from fear and distress.

Key words: Bioethics, animal welfare, in vivo method, aloe vera juice therapy.

ABSTRAK

Metode *In Vivo* pada Terapi Jus Lidah Buaya terhadap Luka Insisi *Pseudomonas aeruginosa*: Kajian Bioetika dan *Animal Welfare*. Masalah etika pokok dalam penelitian biologi adalah adanya pelanggaran kewajiban moral untuk menghormati makhluk hidup, walaupun tujuannya justru untuk memajukan kehidupan manusia. Etika akan menguraikan refleksi penelitian ilmiah tentang tanggung jawab dan batas-batas yang harus dilakukan peneliti. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan secara *in vivo* antara penggunaan jus lidah buaya, sulfanilamide, dan oksitetrasiklin terhadap lama waktu kesembuhan luka insisi akibat infeksi *P. aeruginosa*. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina berumur kurang lebih tiga bulan sebanyak 68 ekor. Sebanyak 36 ekor digunakan untuk penentuan dosis infeksi dengan melakukan insisi pada *musculus longissimus dorsi* dan diinfeksi *P. aeruginosa*. Dosis infeksi pada pengenceran terendah yang dapat menginfeksi 100% hewan coba. Selanjutnya, hewan yang terinfeksi *P. aeruginosa* ini digunakan untuk penelitian terapi topikal dengan empat perlakuan berbeda. Perlakuan I menggunakan terapi topikal jus lidah buaya; Perlakuan II menggunakan sulfanilamide; Perlakuan III

menggunakan oksitetrasiklin, dan Perlakuan IV hanya digunakan akuades, sebagai kontrol, untuk membersihkan luka. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jus lidah buaya memberikan waktu kesembuhan luka yang tercepat ($5,25 \pm 1,035$ hari) dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Secara umum, penelitian ini menggunakan prosedur pada hewan coba dengan lima “bebas”, yaitu bebas dari rasa lapar dan haus; bebas dari rasa tidak nyaman; bebas dari rasa sakit, luka dan penyakit; bebas mengekspresikan tingkah laku normal, dan bebas dari rasa takut dan stres.

Kata kunci: Bioetika, *animal welfare*, metode *in vivo*, terapi jus lidah buaya.

PENDAHULUAN

Lebih dari 2,7 juta hewan coba digunakan di Inggris tahun 2002. Di dunia, hewan digunakan untuk uji coba produk mulai dari produk shampo sampai obat kanker terbaru. Regulasi Inggris mewajibkan bahwa setiap obat baru harus diuji pada sedikitnya dua jenis spesies mamalia yang berbeda. Salah satunya harus menggunakan hewan besar yang bukan termasuk rodensia. Selama ini, uji dengan hewan coba sangat membantu dalam pengembangan vaksin rabies, polio, cacar, dan TBC. Ilmu bedah dengan memakai hewan cobapun banyak membantu penelitian tentang transplantasi organ dan teknik bedah jantung (Anonim 2008).

Dalam *Animal Welfare Act* 1970 yang termasuk dalam hewan riset adalah mamalia laut, hewan ternak, tifus dan mencit laboratorium, dan unggas. Perawatan hewan standar yang diatur dalam *Act* tersebut meliputi periode eksperimen, desain atau metode eksperimen yang jelas juga laporan yang mencatat perawatan harian, terapi termasuk penggunaan obat-obat anestesi, analgesik, dan tranquilizers. Implementasi *Animal Welfare Act Regulation* didukung oleh *US Department Agriculture (USDA)*, *Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)*, dan organisasi *Animal Welfare* dan *Animal Right* (Rollin dan Kesel 1990).

Program kontrol pencegahan penyakit, perawatan hewan dan euthanasia harus berada dalam pengawasan dokter hewan. Penanggung jawab penelitian harus memikirkan alternatif penggunaan anestesi, analgesik, tranquilizers atau euthanasia untuk mengurangi rasa sakit dan stres pada hewan coba (Rollin dan Kesel 1990).

Dalam konteks regulasi termasuk perawatan dan standar perkandangan hewan laboratorium akan dikaji dalam makalah ini sehubungan dengan dengan penelitian menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi dengan *Pseudomonas aeruginosa*.

BAHAN DAN METODE

Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) berumur ± 3 bulan sebanyak 68 ekor dan berjenis kelamin betina yang diperoleh dari Unit Pengembangbiakan Hewan Percobaan, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Tikus putih dipelihara dalam kandang yang terbuat dari plastik berukuran 50 cm x 30 cm, setiap kandang berisi 8 ekor tikus putih yang dipilih secara acak dengan cara diundi. Kandang plastik dan sekam untuk alas hewan coba terlebih dahulu disucikan dengan Rodalon^R

setiap hari sebelum dan selama penelitian dilakukan. Pakan yang diberikan adalah konsentrat yang diproduksi oleh Pokphand (*Hi-Pro-Vit Medicated* 593). Oksitetrasiklin (Oxiject^R) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan produksi PT *Fermenta Animal Health*. Isolat kuman yang digunakan adalah *P. aeruginosa* strain ATCC 27853 yang diperoleh dari Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

METODE PENELITIAN

Adaptasi Hewan Coba

Adaptasi terhadap kondisi kandang dan pakan dilakukan selama satu minggu. Air minum dan pakan standar berupa konsentrat, diberikan secara *ad libitum*. Perlakuan terhadap hewan coba dilaksanakan setelah masa adaptasi.

Pembuatan Suspensi Kuman

Pembuatan suspensi kuman dilakukan dengan cara mengambil 4-5 koloni kuman *P. aeruginosa* dari media *nutrient agar* kemudian dimasukkan ke dalam 4-5 ml *Mueller Hinton Broth*. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-5 jam hingga diperoleh hasil sama dengan kekeruhan suspensi kuman sesuai dengan standar *Mac Farland* No. 1 dengan perkiraan jumlah kuman sebanyak 3×10^8 per ml (Carter dan Cole 1990).

Penentuan Dosis Infeksi

Penentuan dosis infeksi dilakukan untuk menentukan pengenceran kuman terendah yang dapat menginfeksi 100% hewan coba. Hal ini dilakukan untuk menghindari terjadinya septikemia pada hewan coba yang diinfeksi dengan *P. aeruginosa*. Hasil dari penentuan tersebut digunakan pada perlakuan penelitian untuk membuat infeksi buatan pada perlakuan *in vivo*. Pengenceran suspensi kuman secara seri dari 10^{-1} - 10^{-6} dengan cara mengisi enam tabung reaksi, masing-masing 9 ml PZ steril. Pengenceran kuman yang akan didapat adalah 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} .

Penentuan dosis infeksi ini menggunakan 36 ekor tikus putih yang dibagi dalam enam kelompok (pengenceran) dengan enam ulangan. Tikus putih dicukur bulunya dan diinsisi pada musculus *Longissimus dorsi* dengan panjang ± 1 cm dan kedalaman $\pm 0,5$ cm. Luka insisi diinfeksi dengan suspensi kuman sebanyak satu tetes pipet pasteur (0,05 ml) untuk masing-masing pengenceran.

Kepastian *P. aeruginosa* benar-benar menginfeksi hewan coba dilakukan dengan melihat gejala klinis berupa peradangan dan terdapat nanah yang berwarna kehijauan serta pemeriksaan laboratorium berupa pewarnaan Gram, penanaman pada media *nutrient agar*, uji Katalase, uji gula-gula, uji TSIA, uji SIM, dan uji Urease Agar Base (Anonim 1997).

Perlakuan Pengobatan

Perlakuan pengobatan dilakukan setelah luka infeksi *P. aeruginosa* positif dengan ditandai timbulnya abses dan nanah. Hewan coba dibagi secara acak menjadi 4 kelompok yang masing-masing berjumlah 8 ekor sesuai dengan ulangan. Selanjutnya masing-masing kelompok mendapat perlakuan sebagai berikut:

- Kelompok I : perlakuan pengobatan dengan jus lidah buaya.
Kelompok II : perlakuan pengobatan dengan oksitetrasiklin.
Kelompok III : perlakuan pengobatan dengan sulfanilamide.
Kelompok IV : perlakuan dengan menggunakan akuades.

Teknik pelaksanaan perlakuan pengobatan secara topikal. Luka dibersihkan terlebih dahulu dengan akuades steril. Pengobatan diberikan tiga kali sehari dan terus menerus sampai terjadi kesembuhan luka. Pengamatan kesembuhan luka dilakukan bersamaan dengan waktu pengobatan. Lama kesembuhan dihitung dengan satuan hari.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Lama kesembuhan luka untuk perlakuan dengan menggunakan jus lidah buaya dengan delapan kali ulangan hasilnya bervariasi antara empat sampai enam hari dengan rata-rata 5,25 hari. Oksitetrasiklin menunjukkan lama waktu rata-rata 7,25 hari dan sulfanilamide menyembuhkan dalam waktu rata-rata 7,75 hari, sedangkan kontrol mencapai 12,5 hari.

Implikasi Penggunaan Hewan Coba

Tinjauan dari segi bioetik dan *animal welfare*

Dalam *The Farm Animal Welfare Council* (FAWC) bahwa hewan coba dan hewan ternak harus mempunyai kondisi lima “bebas” (Anonim 2008), yaitu (1) bebas dari rasa lapar dan haus; (2) bebas dari ketidaknyamanan; (3) bebas dari rasa sakit, luka, dan penyakit; (4) bebas mengekspresikan tingkah laku normal; dan (5) bebas dari ketakutan dan stres.

Penelitian dilaksanakan di kandang coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, di mana fasilitas untuk perkandangan sudah memenuhi persyaratan terutama untuk suhu, ventilasi, *minimum space requirements*, pakan, air minum, dan pertimbangan khusus misalnya pada hewan baru lahir dan hewan muda.

Di dalam pengujian *in vivo*, biasanya digunakan untuk basis penentuan toksisitas dengan pemberian zat atau senyawa yang diduga beracun pada hewan coba. Pengujian *in vivo* dilakukan karena data yang diperoleh dapat diekstrapolasikan untuk menetapkan dosis berbahaya bagi manusia. Sedangkan kelemahannya, memerlukan banyak hewan coba, biayanya mahal, dan memerlukan banyak waktu pengujian.

Penelitian ini tidak melakukan uji zat atau senyawa beracun tetapi menguji zat atau senyawa yang diduga mempunyai daya terapi herbal pada hewan coba. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi dua kelompok besar. Kelompok I sebanyak 36 ekor dan kelompok II sebanyak 32 ekor. Kelompok I digunakan untuk menentukan dosis infeksi dan kelompok II digunakan untuk melakukan percobaannya. Penentuan dosis infeksi menggunakan 36 ekor yang dibagi dalam enam kelompok dan terdiri dari 6 ekor. Sedangkan kelompok II dibagi dalam 4 kelompok terdiri dari 8 ekor. Seharusnya dalam *Animal Welfare Act* dianjurkan untuk menggunakan sejumlah kecil hewan coba saja (Anonim 2008). Untuk mengurangi jumlah hewan coba yang dipakai dapat dengan (1) memperbaiki teknik eksperimen, (2) memperbaiki teknik analisis data, dan (3) berbagi informasi dengan peneliti yang lain.

Memang tikus lebih cenderung mengalami stres selama penanganan atau jika dikan-dangkan sendirian (*single-caged rat*). Mereka mudah bosan dan mengalami depresi. Contoh depresi, yaitu menurunnya tingkah laku sosial, menurunnya *self-grooming*, menggigit-gigit alas kandang, tidak mau bergerak berputar-putar, menurunnya nafsu makan dan adanya *spectacle effect*, yaitu adanya eksudat di sekitar mata.

Sebelum dilakukan percobaan, hewan coba terlebih dahulu diadaptasikan terhadap kondisi kandang dan pakan selama satu minggu. Kandang memakai bahan dari plastik dan alas kandang dari sekam. Bahan plastik dan alas sekam adalah tempat yang paling disukai oleh tikus. Jika bahan kandang dari kardus dan alas sekam dari kertas, tikus cenderung ingin makan dan mencabik-cabik kertas tersebut. Selain itu, tempat atau kandang yang tidak terstruktur demikian akan menyebabkan tikus merasa cemas dan cenderung tinggal di dekat dinding kandang (Benefiel dan Greenough 1998).

Air minum dan pakan standar berupa konsentrat diberikan secara *ad libitum*, hal ini sesuai dengan *Animal Welfare Act* bahwa hewan coba harus dapat memperoleh air minum dan pakan dengan bebas untuk kesehatan dan ketahanan tubuhnya.

Pembuatan luka insisi menggunakan *scalpel* yang tajam sehingga *musculus longissimus dorsi* dapat secara langsung teriris. *Scalpel* yang kurang tajam (tumpul) akan membuat tikus kesakitan dan menanggung rasa sakit lebih lama. Kemungkinan yang kurang dalam tahap ini adalah tidak diberikan analgesik untuk mengurangi rasa sakit pada waktu dilakukan insisi. Tetapi setelah proses itu, hewan coba segera diberi perlakuan pengobatan di bawah supervisi dokter hewan. Peneliti harus mempunyai sifat menyayangi dan perhatian kepada hewan coba. Tanpa sikap tersebut, tidak ada jaminan bahwa hewan coba memperoleh perawatan yang terbaik.

Menurut *Australian Code of Practice* (Anonim 2008), bahwa kegiatan penelitian dapat menggunakan hewan coba jika dapat memberikan informasi yang relevan untuk manusia dan hewan, untuk tujuan pendidikan dan untuk perbaikan manajemen dan produksi hewan coba. Manusia yang menggunakan hewan coba harus memperlakukan mereka dengan baik dan memperhatikan faktor kesejahteraannya pada waktu merencanakan dan melaksanakan penelitian. Jika memungkinkan tidak perlu dilakukan ulangan penelitian agar meminimalkan sakit dan stres.

KESIMPULAN

1. Penelitian yang dilakukan harus menggunakan hewan coba tidak dapat digantikan.
2. Penelitian yang dilakukan dengan pertimbangan memberikan manfaat bagi hewan dan manusia.
3. Jumlah hewan coba harus dikurangi.
4. Peneliti didampingi dengan supervisor yang ahli dibidang kedokteran hewan.
5. Tempat penelitian mempunyai fasilitas lengkap untuk hewan coba.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2008.** <http://www.bbc.co.uk/religion/ethics/animals/using/caring>.
- Anonim. 1997.** Petunjuk Praktikum Ilmu Penyakit Bakterial. Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Benefiel, A.C. and W.T. Greenough. 1998.** Effects of experience and environment on the developing and mature brain: Implications for Laboratory Animal Housing. ILAR Journal 39(1):35-45.
- Carter, G.R. and J.R. Cole. 1990.** Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Micology. 5th ed. Antimicrobial Agents and Susceptibility Testing by M.M. Chengappa.
- Rollin, B.E. and M.L. Kesel. 1990.** The Experimental Animal in Biomedical Research. Vol. 1 Boca Raton, Ann Harbour. Boston, MA. CRC Press.