



**BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA**

PERATURAN BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
NOMOR 10 TAHUN 2022
TENTANG
PEDOMAN UJI TOKSISITAS PRAKLINIK SECARA IN VIVO

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

- Menimbang : a. bahwa untuk menjamin keamanan pemaparan suatu zat pada manusia, perlu dilakukan uji toksisitas praklinik secara in vivo untuk mempelajari efek kumulatif dosis yang dapat menimbulkan efek toksik pada manusia, efek karsinogenik, teratogenik, mutagenik dan efek lain yang berpotensi menimbulkan risiko kesehatan bagi manusia;
- b. bahwa Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 7 Tahun 2014 tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik secara In Vivo sudah tidak sesuai dengan kebutuhan hukum serta perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi sehingga perlu diganti;
- c. bahwa berdasarkan ketentuan Pasal 3 ayat (1) huruf d Peraturan Presiden Nomor 80 Tahun 2017 tentang Badan Pengawas Obat dan Makanan, Badan Pengawas Obat dan Makanan memiliki fungsi pelaksanaan tugas pengawasan sebelum beredar dan pengawasan selama beredar;
- 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 Toksisitas Praklinik secara In Vivo;

- Mengingat : 1. Peraturan Presiden Nomor 80 Tahun 2017 tentang Badan Pengawas Obat dan Makanan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2017 Nomor 180);
2. 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);

MEMUTUSKAN:

Menetapkan : PERATURAN BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN TENTANG PEDOMAN UJI TOKSISITAS PRAKLINIK SECARA IN VIVO.

Pasal 1

Dalam Peraturan Badan ini yang dimaksud dengan:

1. Uji Toksisitas Praklinik secara In Vivo yang selanjutnya disebut Uji Toksisitas adalah uji yang dilakukan pada hewan uji untuk mendeteksi efek toksik pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis respon yang khas dari sediaan uji.
2. Obat adalah bahan atau paduan bahan, termasuk produk biologi yang digunakan untuk mempengaruhi atau menyelidiki sistem fisiologi atau keadaan patologi dalam rangka penetapan diagnosis, pencegahan, penyembuhan, pemulihan, peningkatan kesehatan dan kontrasepsi, untuk manusia.
3. 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.
4. Obat Kuasi adalah sediaan yang mengandung bahan aktif dengan efek farmakologi yang bersifat non sistemik atau lokal dan untuk mengatasi keluhan ringan.

5. Suplemen Kesehatan adalah produk yang dimaksudkan untuk melengkapi kebutuhan zat gizi, memelihara, meningkatkan dan/atau memperbaiki fungsi kesehatan, mempunyai nilai gizi dan/atau efek fisiologis, mengandung satu atau lebih bahan berupa vitamin, mineral, asam amino dan/atau bahan lain bukan tumbuhan yang dapat dikombinasi dengan tumbuhan.
6. Kosmetika adalah bahan atau sediaan yang dimaksudkan untuk digunakan pada bagian luar tubuh manusia seperti epidermis, rambut, kuku, bibir dan organ genital bagian luar, atau gigi dan membran mukosa mulut terutama untuk membersihkan, mewangikan, mengubah penampilan dan/atau memperbaiki bau badan atau melindungi atau memelihara tubuh pada kondisi baik.
7. Pangan Olahan adalah makanan atau minuman hasil proses dengan cara atau metode tertentu dengan atau tanpa bahan tambahan.
8. Badan Pengawas Obat dan Makanan yang selanjutnya disingkat BPOM adalah lembaga pemerintah nonkementerian yang menyelenggarakan urusan pemerintahan di bidang pengawasan Obat dan Makanan.

Pasal 2

- (1) Pelaku usaha atau lembaga penelitian/riset melakukan Uji Toksisitas untuk menjamin keamanan obat dan makanan.
- (2) Obat dan makanan sebagaimana dimaksud pada ayat (1) meliputi produk:
 - a. Obat;
 - b. Obat Tradisional;
 - c. Obat Kuasi;
 - d. Suplemen Kesehatan;
 - e. Kosmetika; dan
 - f. Pangan Olahan.
- (3) Obat sebagaimana dimaksud pada ayat (2) huruf a merupakan Obat jadi.

- (4) Untuk melakukan Uji Toksisitas sebagaimana dimaksud pada ayat (1), pelaku usaha atau lembaga penelitian/riset harus terlebih dahulu memperoleh persetujuan dari komisi etik.
- (5) Selain harus memperoleh persetujuan dari komisi etik sebagaimana dimaksud pada ayat (4), Uji Toksisitas untuk Obat Tradisional, Obat Kuasi, dan Suplemen Kesehatan harus memperoleh persetujuan pelaksanaan uji praklinik dari BPOM.
- (6) Prosedur pengajuan persetujuan pelaksanaan uji praklinik sebagaimana dimaksud pada ayat (5) dilaksanakan sesuai dengan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan yang mengatur mengenai standar pelayanan publik di lingkungan Badan Pengawas Obat dan Makanan.
- (7) Uji Toksisitas sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dilaksanakan sesuai dengan pedoman Uji Toksisitas.

Pasal 3

- (1) Pedoman Uji Toksisitas sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 digunakan sebagai acuan bagi:
 - a. evaluator BPOM dalam melakukan evaluasi kesesuaian pemenuhan aspek keamanan berdasarkan pembuktian ilmiah terhadap protokol Uji Toksisitas dan/atau data toksisitas;
 - b. pelaku usaha di bidang obat dan makanan sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan dalam mengajukan protokol Uji Toksisitas dan/atau menyampaikan data toksisitas untuk mendukung aspek keamanan obat dan makanan; dan
 - c. lembaga penelitian/riset sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan dalam mengembangkan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang obat dan makanan.

- (2) Pedoman Uji Toksisitas sebagaimana dimaksud pada ayat (1) meliputi:
- a. ketentuan umum pada Uji Toksisitas;
 - b. Uji Toksisitas meliputi:
 1. uji toksisitas akut oral;
 2. uji toksisitas subkronis oral;
 3. uji toksisitas kronis oral;
 4. uji teratogenesis;
 5. uji sensitisasi kulit;
 6. uji iritasi mata;
 7. uji iritasi/korosi akut dermal;
 8. uji iritasi mukosa vagina;
 9. uji toksisitas akut dermal;
 10. uji toksisitas subkronis dermal; dan
 11. uji karsinogenesis.
 - c. penjelasan teknis Uji Toksisitas.
- (3) Pedoman Uji Toksisitas sebagaimana dimaksud pada ayat (1) tercantum dalam Lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan Badan ini.

Pasal 4

Pelaku usaha sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 ayat (1) huruf b dapat menggunakan Uji Toksisitas atau metodologi lain berdasarkan referensi ilmiah yang sahih dan/atau metode yang tervalidasi.

Pasal 5

Protokol Uji Toksisitas dan/atau data toksisitas yang telah diajukan sebelum berlakunya Peraturan Badan ini, tetap diproses berdasarkan Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 7 Tahun 2014 tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik secara In Vivo.

Pasal 6

Pada saat Peraturan Badan ini mulai berlaku, Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 7 Tahun 2014 tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik secara In Vivo (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 875), dicabut dan dinyatakan tidak berlaku.

Pasal 7

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 18 Mei 2022

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

ttd.

PENNY K. LUKITO

Diundangkan di Jakarta
pada tanggal 19 Mei 2022

MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
REPUBLIK INDONESIA,

ttd.

YASONNA H. LAOLY

BERITA NEGARA REPUBLIK INDONESIA TAHUN 2022 NOMOR 490

Salinan Sesuai Dengan Aslinya

BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN

Kepala Biro Hukum dan Organisasi,



Reghi Perdana

LAMPIRAN
PERATURAN BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA
NOMOR 10 TAHUN 2022
TENTANG
PEDOMAN UJI TOKSISITAS PRAKLINIK SECARA IN VIVO

BAB I
PENDAHULUAN

Bahaya akibat paparan suatu zat pada manusia dapat diketahui dengan mempelajari efek kumulatif, dosis yang dapat menimbulkan efek toksik pada manusia, efek karsinogenik, teratogenik, mutagenik, dan lain-lain. Pada umumnya informasi tersebut dapat diperoleh dari percobaan menggunakan hewan uji sebagai model yang dirancang pada serangkaian uji toksisitas yang meliputi uji toksisitas akut oral, toksisitas subkronis oral, toksisitas kronis oral, teratogenisitas, sensitisasi kulit, iritasi mata, iritasi akut dermal, iritasi mukosa vagina, toksisitas akut dermal, toksisitas subkronis dermal dan uji karsinogenisitas. Uji toksisitas pada hewan uji dilakukan sebagai salah satu bukti dukung terhadap keamanan suatu sediaan uji. Pemilihan uji tersebut, tergantung dari tujuan penggunaan suatu zat, lama penggunaan suatu zat dan kemungkinan terjadinya risiko akibat paparan pada manusia.

Keabsahan uji toksisitas sangat dipengaruhi beberapa faktor yaitu sediaan uji, penyiapan sediaan uji, hewan uji, dosis, teknik dan prosedur pengujian, serta kemampuan SDM sehingga sangat diperlukan pemahaman terhadap bermacam-macam faktor tersebut. Agar keabsahan hasil uji toksisitas dapat terjamin dan diterima secara nasional dan internasional, maka perlu dibuat pedoman uji toksisitas yang dapat dipertanggungjawabkan dan mengacu pada pedoman yang sudah baku.

Pedoman ini disusun berdasarkan pada peraturan dan tata cara uji toksisitas terkini dari *World Health Organization* (WHO), *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), *International Organization for*

Standardization (ISO) seperti ISO 17025, dan buku-buku pedoman resmi tentang uji toksisitas yang berlaku di berbagai negara termasuk Indonesia. Pedoman ini meliputi uji toksisitas akut oral, toksisitas subkronis oral, toksisitas kronis oral, teratogenisitas, sensitisasi kulit, iritasi mata, iritasi akut dermal, iritasi mukosa vagina, toksisitas akut dermal, toksisitas subkronis dermal, dan uji karsinogenisitas.

Pedoman ini disusun dengan tujuan agar dapat digunakan sebagai pedoman uji toksisitas praklinik dalam pengembangan Obat baru, Obat Tradisional, Obat Kuasi, Suplemen Kesehatan, Kosmetika dan Pangan Olahan, oleh lembaga penelitian/ riset, pelaku usaha yang terkait dengan pengembangan produk, serta pihak-pihak lain yang terkait. Uji Toksisitas Praklinik secara In Vivo dalam rangka registrasi Obat Tradisional, Obat Kuasi dan Suplemen Kesehatan dapat dilaksanakan setelah memperoleh Persetujuan Pelaksanaan Uji Praklinik (PPUPK) dari Badan Pengawas Obat dan Makanan.

Prosedur penanganan hewan uji dalam pelaksanaan Uji Toksisitas Praklinik secara In Vivo dilakukan oleh tenaga yang kompeten sesuai dengan prinsip-prinsip *Good Laboratory Practice* (GLP) serta menerapkan tiga prinsip etik penelitian hewan laboratorium yaitu 3 R yang meliputi *replacement*, *reduction* dan *refinement*.

BAB II

KETENTUAN UMUM UJI TOKSISITAS PRAKLINIK SECARA IN VIVO

A. PERSETUJUAN KOMISI ETIK

Pada setiap uji yang menggunakan hewan harus mendapatkan Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*) dari Komisi Etik yang dapat menilai protokol untuk hewan sebelum pengujian dimulai.

B. SEDIAAN UJI

Hasil uji toksisitas sangat tergantung pada sifat zat yang diuji. Sediaan uji untuk uji toksisitas berupa zat yang dapat larut atau tersuspensi dalam air atau dapat larut dalam minyak, yang dapat berasal dari tanaman, hewan maupun hasil sintesis organik.

1. Sediaan uji yang berupa zat kimia memerlukan informasi berikut:
 - a. Identitas bahan
 - b. Sifat fisiko-kimia
 - c. Kemurnian
 - d. Kadar cemaran
2. Sediaan uji yang berupa simplisia dan/atau ekstrak tanaman obat memerlukan informasi berikut:
 - a. Nama latin dan nama daerah tanaman
 - b. Deskripsi daerah penanaman (jika tersedia)
 - c. Bagian tanaman yang digunakan
 - d. Pemerian
 - e. Cara pembuatan dan penanganan
 - f. Kandungan kimia
 - g. Riwayat empiris

C. PENERAPAN CARA BERLABORATORIUM HEWAN UJI YANG BAIK

Uji Toksisitas Praliniik secara In Vivo dilaksanakan di laboratorium hewan uji. Laboratorium hewan uji menerapkan cara berlaboratorium hewan uji yang baik yang dapat mengacu pada *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* yang terkini atau pada Peraturan Menteri Pertanian Nomor

44/Permentan/OT.140/5/2007 Tahun 2007 tentang Pedoman Berlaboratorium Veteriner yang Baik (*Good Veterinary Laboratory Practice*).

Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian Nomor 44/Permentan/OT.140/5/2007 Tahun 2007, sarana fisik dan lingkungan laboratorium hewan uji yang diperlukan adalah sebagai berikut:

1. Bangunan dan sarana fisik:

- a. Bersifat permanen, kuat dan mudah dalam pemeliharaannya;
- b. Memiliki fasilitas sumber air yang memadai;
- c. Memiliki sumber energi listrik dan cahaya yang memadai/cukup untuk menerangi ruangan;
- d. Memiliki ruang yang cukup luas untuk ruang gerak petugas dan alat-alat;
- e. Memiliki sistem ventilasi yang baik;
- f. Memiliki dinding kedap air, tidak korosif, mudah dibersihkan dan didesinfeksi;
- g. Memiliki sistem pengatur suhu ruang;
- h. Memiliki langit-langit yang tidak mudah mengelupas dan memiliki bentuk yang lengkung/tidak membentuk sudut pada pertemuan antara dinding dengan lantai dan dinding dengan dinding sehingga tidak terjadi akumulasi kotoran;
- i. Memiliki lantai yang rata, halus, kuat, tidak licin, tidak mudah pecah, kedap air, terbuat dari bahan yang tahan terhadap zat-zat kimia dan api, mudah dibersihkan dan didesinfeksi;
- j. Memiliki pintu, jendela dan kusen terbuat dari bahan bukan kayu, tidak korosif, kedap air, tidak toksik dan tahan hama;
- k. Tersedia fasilitas meja laboratorium yang tahan terhadap bahan kimia, air, rayap dan tidak korosif;
- l. Tersedia ruangan yang terpisah dengan baik untuk pengujian yang berbeda dan tidak saling mempengaruhi;
- m. Tersedia fasilitas pengendalian akses ke luar masuk ruangan laboratorium tertentu;

- n. Tersedia fasilitas untuk melakukan kegiatan pengujian yang menggunakan hewan uji.

2. Peralatan

Peralatan yang dipergunakan dalam pemeriksaan dan pengujian harus memenuhi persyaratan sebagai berikut:

- a. Disesuaikan dengan ruang lingkup pemeriksaan dan pengujian;
- b. Ketelusuran (*traceability*) dan dikalibrasi secara berkala;
- c. Dirawat dan ditempatkan pada tempat yang sesuai dengan fungsinya;
- d. Dilengkapi dengan petunjuk penggunaan alat dan buku catatan pemakaian;
- e. Mempunyai penanggung jawab sesuai jenis dan fungsi peralatannya;
- f. Dioperasikan oleh petugas yang memiliki kompetensi sesuai bidangnya;
- g. Dibersihkan dan dikembalikan pada tempatnya sesuai dengan kondisi semula;
- h. Prosedur perawatan dan pemakaian harus didokumentasikan;
- i. Mempunyai rekaman untuk setiap jenis peralatan yang mencakup spesifikasi dan informasi dari produsen mengenai pembuat alat, nama peralatan, nama pabrik, identitas jenis dan nomor seri, letaknya pada saat ini, kondisi saat diterima, dan petunjuk penggunaan alat;
- j. Mencantumkan tanggal hasil kalibrasi, jadwal rencana perawatan yang akan dilakukan serta riwayat terjadinya kerusakan dan atau perbaikan peralatan yang telah dilakukan.

3. Lingkungan

Lingkungan laboratorium harus memenuhi persyaratan sebagai berikut:

- a. Kelayakan lingkungan, tata ruang untuk sebuah laboratorium veteriner;
- b. Memiliki sistem dan fasilitas pengelolaan limbah;
- c. Memiliki sistem pencegahan gangguan serangga dan hewan pengganggu seperti tikus, dan binatang pengerat lainnya

D. PENYIAPAN SEDIAAN UJI

Sediaan uji dapat berupa bahan baku atau produk jadi yang terstandardisasi, baik dalam bentuk bahan tunggal maupun dalam kombinasi sesuai dengan komposisinya. Sediaan uji dapat dibuat dengan bermacam-macam cara, sesuai dengan sifat sediaan uji dan cara pemberiannya. Sediaan uji dapat berupa:

1. Formulasi dalam media cair

Sediaan uji jika diperlukan dapat dilarutkan pada cairan pembawa yang *inert*, dengan ketentuan sebagai berikut:

- a. Jika sediaan uji larut air maka dilarutkan dalam air.
- b. Jika sediaan uji sukar larut air atau tidak larut air maka disuspensikan/diemulsikan dengan pelarut/agen pensuspensi/agen pengemulsi yang sesuai misalnya CMC (*carboxy methyl cellulose*) 0,3 – 1,0 %, minyak nabati (misalnya minyak zaitun, minyak wijen, dan minyak jagung) atau pelarut lain yang lazim digunakan.
- c. Jika sediaan uji sudah dalam bentuk cairan dapat langsung diberikan tanpa dilarutkan pada cairan pembawa.

Untuk sediaan uji yang berasal dari simplisia tanaman obat, pembuatan sediaan uji simplisia tanaman obat dibuat seperti penggunaan pada manusia atau cara lain yang sesuai, misalnya penyarian dengan etanol. Penyarian menggunakan air dapat dilakukan dengan cara diseduh, direbus atau dengan cara penyarian yang lain selama dapat menjamin tersarinya kandungan simplisia secara sempurna. Pada pemekatan untuk mencapai dosis yang diinginkan, maka suhu pemanasan tidak boleh menyebabkan berkurangnya kandungan zat berkhasiat. Simplisia yang mengandung minyak atsiri, penyiapan dan pemekatan sediaan uji dilakukan dalam wadah tertutup dan dilakukan penyaringan setelah dingin. Penyarian dengan menggunakan etanol dapat dilakukan dengan cara dingin, misalnya maserasi, perkolasi, atau dengan cara panas misalnya disoksletasi, direfluks dan selanjutnya disaring kemudian diuapkan untuk menghilangkan etanol dan sisa penguapan dilarutkan dalam air dan disuspensikan menggunakan tragakan 1-2%, CMC 1-2% (sesuai

kebutuhan), atau bahan pensuspensi lain yang sesuai.

2. Campuran pada makanan

Pada uji toksisitas dengan pemberian berulang seperti pada uji toksisitas subkronis, dengan pertimbangan kepraktisan, sediaan uji dapat diberikan dengan mencampur dalam makanan atau minuman hewan uji. Namun harus diperhatikan bahwa dosis yang diberikan harus tetap dan sesuai untuk setiap hewan uji, dosis berdasarkan berat badan dan perhitungan jumlah makanan dan minuman yang dikonsumsi setiap hari. Direkomendasikan menggunakan kandang individual.

E. VOLUME PEMBERIAN SEDIAAN UJI SECARA ORAL

Volume cairan maksimal yang dapat diberikan tergantung pada ukuran (berat badan) setiap hewan uji. Pada rodensia, jumlah normalnya tidak melampaui 1 mL/100 g berat badan, namun bila pelarutnya air (*aqueous*) dapat diberikan hingga 2 mL/100 g berat badan. Bila pelarutnya air (*aqueous*), pada tikus dengan berat badan >250 gram, batas volume maksimal yang dapat diberikan adalah 5 mL, dan pada mencit dengan berat badan >50 gram, batas volume maksimal yang dapat diberikan adalah 1 mL.

F. DOSIS UJI

Umumnya dosis uji harus mencakup dosis yang setara dengan dosis penggunaan yang lazim pada manusia. Dosis lain meliputi dosis dengan faktor perkalian tetap yang mencakup dosis yang setara dengan dosis penggunaan lazim pada manusia sampai mencapai dosis yang dipersyaratkan untuk tujuan pengujian atau sampai batas dosis tertinggi yang masih dapat diberikan pada hewan uji sesuai kemampuan lambung hewan uji yang digunakan.

Namun, pada uji toksisitas akut, sehubungan dengan tujuan utama uji toksisitas akut adalah mencari LD₅₀ sehingga dosis awal yang digunakan memang yang menimbulkan efek toksik ringan berdasarkan informasi awal atau apabila tidak tersedia informasi menggunakan dosis sesuai yang direkomendasikan.

G. KELOMPOK KONTROL

Pada setiap percobaan digunakan kelompok kontrol yang diberi pelarut/ pembawa sediaan uji dan digunakan juga kelompok kontrol tanpa perlakuan tergantung dari jenis uji toksisitas.

H. CARA PEMBERIAN SEDIAAN UJI

Pada dasarnya pemberian sediaan uji harus sesuai dengan cara pemberian atau paparan yang diterapkan pada manusia misalnya peroral (PO), topikal, injeksi intravena (IV), injeksi intraperitoneal (IP), injeksi subkutan (SK), injeksi intrakutan (IK), inhalasi, melalui rektal dll.

I. HEWAN UJI

Pada prinsipnya jenis hewan yang digunakan untuk uji toksisitas harus dipertimbangkan berdasarkan sensitivitas, cara metabolisme sediaan uji yang serupa dengan manusia, kecepatan tumbuh serta mudah tidaknya cara penanganan sewaktu dilakukan percobaan. Hewan pengerat merupakan jenis hewan yang memenuhi persyaratan tersebut diatas, sehingga paling banyak digunakan pada uji toksisitas. Hewan yang digunakan harus sehat; asal, jenis dan galur, jenis kelamin, usia serta berat badan harus jelas. Biasanya digunakan hewan muda dewasa, dengan variasi bobot tidak lebih dari 20%. Adapun kriteria hewan yang digunakan dapat dilihat pada tabel 1. Namun, kriteria umur hewan uji dapat menyesuaikan dengan kebutuhan pengujian toksisitas yang akan dilakukan.

Tabel 1. Kriteria hewan uji yang digunakan dalam uji toksisitas

No	Jenis hewan	Bobot minimal	Rentang umur
1	Mencit	20 g	6 – 8 minggu
2	Tikus	120 g	6 – 8 minggu*
3	Marmut	250 g	4 – 5 minggu
4	Kelinci	1800 g	8 – 9 bulan

Untuk uji toksisitas kronik oral, umur hewan uji disesuaikan dengan penjabaran pada Uji Toksisitas Kronik Oral pada Bab III.

J. KONDISI RUANGAN DAN PEMELIHARAAN HEWAN UJI

Ruangan yang digunakan untuk pengujian hendaknya memenuhi persyaratan suhu, kelembaban, cahaya dan kebisingan yang sesuai dengan kebutuhan hidup hewan uji, yaitu suhu ruangan diatur menjadi $22^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{ C}$, dengan kelembaban relatif 30–70% dan penerangan 12 jam terang 12 jam gelap. Ruangan harus selalu dijaga kebersihannya. Hewan diberi pakan dan minum yang sesuai standar laboratorium dan diberikan *ad libitum* kecuali tujuan penelitian yang memerlukan pakan khusus atau pembatasan asupan pangan.

Hewan dipelihara dalam kandang yang terbuat dari material yang kedap air, kuat dan mudah dibersihkan secara berkala, ruang pemeliharaan bebas dari kebisingan. Luas area kandang per ekor hewan mengacu pada *Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* oleh *National Research Council Amerika Serikat* (2011) seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Luas area kandang per ekor hewan uji

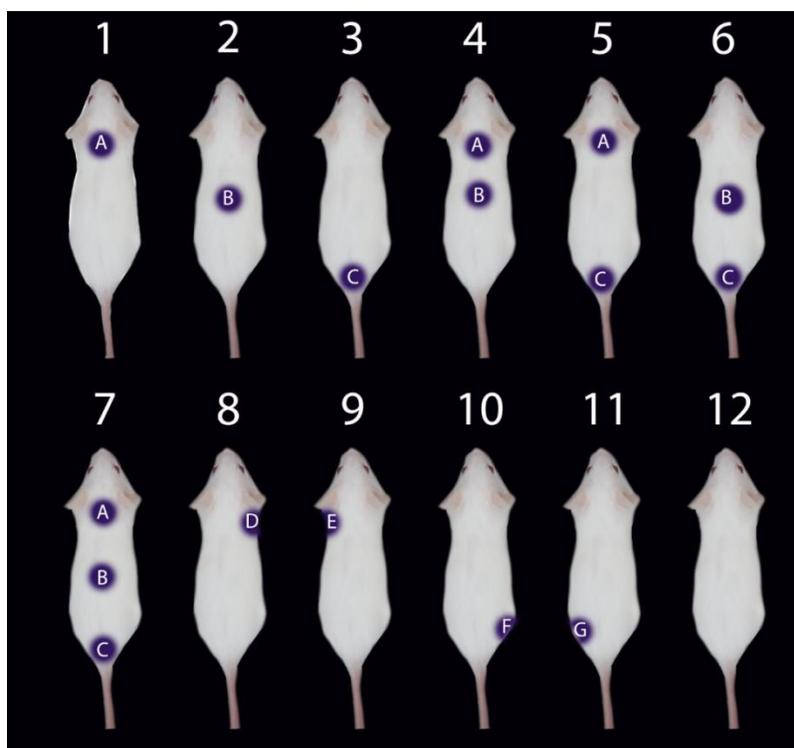
No.	Hewan Uji	Bobot Badan (g)	Luas Kandang Minimal (cm ²)	Tinggi Kandang Minimal (cm)
1	Mencit	15-25	80	13
2	Tikus	100-200	150	18
3	Marmut	250-350	390	18
4	Kelinci	2000-4000	300	41

Sebelum perlakuan hewan uji diaklimatisasi terlebih dahulu selama 5-7 hari.

K. RANDOMISASI DAN CARA PENANDAAN HEWAN UJI

Hewan uji dilakukan randomisasi dengan secara acak dimasukkan ke dalam setiap kelompok sesuai dengan pengelompokan hewan uji. Setelah pengacakan, tidak ada perbedaan yang signifikan dalam rata-rata berat badan antar kelompok.

Setiap hewan harus diberi nomor identifikasi unik, dan diberi tanda secara permanen. Penandaan hewan uji dapat dilakukan dengan cara memberikan penanda yang sesuai (misalnya penanda yang tidak toksik atau *food grade*) atau larutan asam pikrat 10% dalam alkohol. Walaupun demikian penggunaan larutan asam pikrat sebaiknya dihindari karena berisiko meledak dan membahayakan personil maupun fasilitas. Penandaan dilakukan dengan tujuan membedakan antara hewan satu dengan yang lainnya. Penandaan biasanya dilakukan seperti pada Gambar 1 dan Tabel 3.



Gambar 1. Tempat penandaan hewan uji pada beberapa bagian tubuh hewan (sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

Tabel 3. Tempat penandaan hewan uji

No Hewan	Tanda	Tempat
1	A	Kepala
2	B	Punggung
3	C	Ekor
4	A & B	Kepala & Punggung
5	A & C	Kepala & Ekor
6	B & C	Punggung & Ekor
7	A,B & C	Kepala, Punggung & Ekor
8	D	Kaki kanan depan
9	E	Kaki kiri depan
10	F	Kaki kanan belakang
11	G	Kaki kiri belakang
12	-	Tidak diberi tanda apapun

L. CARA MEMEGANG (*HANDLING*) HEWAN UJI

Cara memegang hewan uji jenis rodensia berbeda antara tikus dan mencit pada saat pemberian sediaan uji secara oral. Pemegangan yang benar sangat diperlukan sewaktu pemberian sediaan uji, karena pemegangan yang salah dapat berakibat fatal. Cara pemegangan yang salah dapat menyebabkan antara lain: sediaan uji yang diberikan tidak dapat masuk kedalam lambung tetapi masuk kedalam paru-paru, sehingga mengakibatkan kematian hewan uji. Disisi lain, pemegangan yang salah juga dapat mengakibatkan terjadinya kecelakaan kerja seperti tergigit oleh hewan. Cara pemegangan hewan yang benar dapat dilihat pada Gambar 2, 3 dan 4.



Gambar 2. Cara memegang mencit pada pemberian sediaan uji secara oral (sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)



Gambar 3. Cara memegang tikus pada pemberian sediaan uji secara oral
(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)



Gambar 4. Cara memegang kelinci

(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

M. PENGAMBILAN DAN PENANGANAN DARAH HEWAN UJI

1. Pengambilan Darah Hewan Uji

Pengambilan darah menggunakan alat suntik steril atau alat yang sesuai yang steril dan selalu dijaga agar tidak terjadi hemolisis. Pada umumnya pengambilan darah yang terlalu banyak pada hewan kecil akan menyebabkan syok hipovolemik, stres, dan bahkan dapat menyebabkan kematian. Pengambilan darah yang tidak sesuai aturan juga dapat menyebabkan anemia pada hewan pengujian. Pada umumnya pengambilan darah hanya dilakukan sekitar 10% dari total volume darah pada tubuh hewan uji dalam selang waktu 2-4 minggu (total volume darah adalah 79 mL/kg berat badan pada mencit dan 64 mL/kg berat badan pada tikus).

Atau sekitar 1% dari berat tubuh dengan interval 24 jam. Batas maksimal koleksi darah yang tidak meresikokan keselamatan hewan (*one time sampling*) adalah 7.7 mL/kg berat badan untuk mencit dan 5.5 mL/kg berat badan untuk tikus. Pengambilan darah dapat dilakukan melalui:

a. Ekor

Darah dapat diperoleh dengan mudah pada saluran perpendikularis pada permukaan ekor. Pengambilan sampel darah melalui vena lateral atau arteri ventral ekor mudah dilakukan, dan memungkinkan untuk dilakukan pengulangan (Gambar 5). Koleksi dapat dilakukan dengan *syringe* maupun hanya dengan jarum untuk langsung ditampung ke dalam vial.



Gambar 5. Pengambilan darah tikus di ekor

(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

b. Mata

Hewan sebelumnya dianestesi, lokasi pengambilan darah pada sinus retro-orbitalis mata dengan menggunakan pipet Pasteur atau tabung hematokrit. Aplikasi dapat dilakukan dengan menusukkan pipet dengan sudut kemiringan 45°. Sampel dapat diperoleh dari kedua mata secara bergantian (Gambar 6). Metode ini dapat menghasilkan volume darah dalam jumlah besar, namun dapat mengakibatkan trauma pada mata dan kebutaan (terutama pada tikus) sehingga harus dilakukan oleh personil yang kompeten. Koleksi darah melalui perlukaan retro-orbital

lebih umum dilakukan pada mencit dan tidak disarankan pada hewan tikus karena memerlukan beberapa syarat khusus.



Gambar 6. Pengambilan darah mencit di mata

(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

c. Vena jugularis

Setelah hewan dianestesi, darah diambil dari vena jugularis secara perlahan-lahan menggunakan alat suntik steril, satu alat suntik digunakan untuk satu hewan (Gambar 7). Dihindari pembentukan hematoma dan harus dilakukan tekanan di lokasi tusukan selama minimal 30 menit.

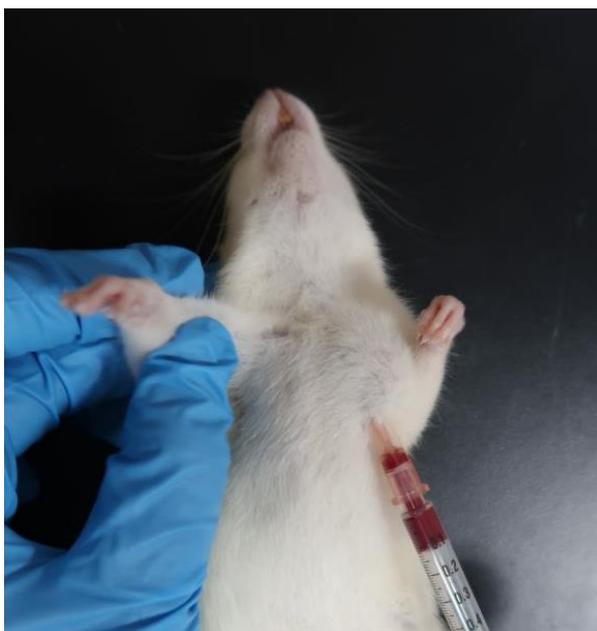


Gambar 7. Pengambilan darah tikus di vena jugularis

(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

d. Intrakardium

Teknik ini dilakukan pada hewan yang terbius sebagai metode terminal (di akhir uji) dan umumnya jika darah yang dibutuhkan banyak dan tikus yang diambil darahnya ini akan dikorbankan lalu dinekropsi untuk diambil organnya (Gambar 8). Setelah dilakukan anestesi dan eutanasia, kemudian dilakukan pembedahan dan tusukkan jarum suntik langsung ke jantung dan tarik perlahan. Teknik ini dapat pula dilakukan tanpa harus membuka rongga toraks, yakni dengan mengakses jantung dari sisi kiri dada, merasakan/palpitasi denyut jantung lalu memasukkan jarum antara iga ke 3 dan 5, lalu koleksi secara perlahan



Gambar 8. Pengambilan darah tikus di intrakardium

(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

e. Vena saphena

Koleksi dari rute ini dapat dilakukan dalam kondisi hewan terbius maupun tidak, sepanjang hewan dikendalikan (*restrained*) dengan baik dan kaki belakang dapat diakses dengan leluasa. Darah dapat dikoleksi dari vena saphena lateral yang terletak agak di dorsal kaki belakang lalu menyilang lateral di atas persendian tarsal. Kaki belakang perlu ditahan lalu sedikit ditarik agar posisi ekstensi. Bagian kaki tepat di atas persendian perlu diberi sedikit tekanan untuk memudahkan proses koleksi.



Gambar 9. Pengambilan darah tikus di vena saphena (Villano and Sharp 2012)

f. Vena submandibularis

Teknik ini lebih umum diaplikasikan pada mencit. Prosedur dapat dilakukan dengan lanset khusus maupun dengan jarum dengan sudut 30 derajat. Hewan harus dikendalikan dengan posisi jari menahan/mencubit rambut di area tengkuk (*scruff*) untuk memudahkan mengekspos area pipi. Orientasi menusukkan jarum atau lanset adalah pada titik di tengah pipi, yaitu area sejajar dengan canthus lateral mata dan diatas titik keabuan di garis rahang (*jawline*).



Gambar 10. Pengambilan darah tikus di vena submandibularis (Villano and Sharp 2012)

2. Penanganan Darah Hewan Uji

Untuk memperoleh serum, darah total (*whole blood*) dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit,

kemudian dipindahkan ke dalam es tidak lebih dari 20 menit dan segera disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan segera dalam lemari beku (-20°C) untuk *assay*.

Jika diinginkan plasma, maka darah total (*whole blood*) diberikan Garam Etilen Diamin Tetra Asetat (Na₂EDTA, K₂EDTA atau K₃EDTA) atau natrium sitrat atau heparin (antikoagulan). Garam EDTA paling banyak digunakan karena jarang berinterferensi dengan *assay* yang dilakukan. Umumnya digunakan kadar garam EDTA sebesar 1,5 mg/mL atau 5 mM pada konsentrasi akhir.

N. RENTANG NILAI KONTROL RATA-RATA PARAMETER BIOKIMIA KLINIS DAN HEMATOLOGI PADA HEWAN UJI

Berdasarkan beberapa literatur, rentang nilai kontrol rata-rata parameter biokimia klinik dan hematologi pada hewan uji yang dapat diacu adalah sebagai berikut:

a. Parameter biokimia klinis

Tabel 4. Mencit galur BALB/c
(Darelanko, Michael J, Auletta, Carol S, 2014)

Parameter (satuan)	Umur 1-3 Bulan	Umur 6-12 Bulan
Albumin (g/dl)	1,6 – 2,6	1,3 -2 ,6
Alkalin fosfatase (IU/l)	75 - 275	47 - 102
ALT (IU/l)	-	-
AST (IU/l)	40 - 140	70 - 110
Total bilirubin (mg/dl)	0,5 -1,2	0,4 – 1,0
Kalsium (mg/dl)	7,8 – 10,8	6,5 – 9,6
Kolesterol total (mg/dl)	165 -295	100 – 300
Creatinin (mg/dl)	-	-
Glukosa (mg/dl)	75 - 150	40 - 160
Fosfor anorganik (mg/dl)	4,5 – 8,9	4,7 – 7,2
Kalium (mEq/l)	-	-
Total protein (g/dl)	4,4 – 6,0	4,4 – 6,4
Natrium (mEq/l)	-	-
Trigliserida (mg/dl)	-	-
BUN (mg/dl)	10-30	10-30

Tabel 5. Tikus galur Sprague Dawley
(Darelanko, Michael J, Auletta, Carol S, 2014)

Parameter (satuan)	Umur 10-12 Minggu	Umur 18-20 Minggu	Umur 32-34 Minggu	Umur 58-60 Minggu
ALT (IU/l)	10 - 40	10 - 50	10 - 50	20 - 60
Albumin (g/dl)	3,4 - 4,1 (M) 3,5 - 4,5 (F)	3,3 - 4,2 (M) 3,5 - 4,7 (F)	3,5 - 4,0 (M) 4,0 - 5,0 (F)	3,0 - 3,8 (M) 3,5 - 4,5 (F)
Alkalin fosfatase (IU/l)	140 - 300 (M) 80 - 100 (F)	50 - 150 (M) 25 - 150 (F)	50 - 150 (M) 25 - 100 (F)	50 - 150 (M) 25 - 100 (F)
AST (IU/l)	45 - 90	45 - 100	45 - 120	60 - 120
Asam empedu (µmol/l)	20 - 60	20 - 6-	-	-
Total bilirubin (mg/dl)	0,2 - 0,4	0,1 - 0,5	0,1 - 0,5	0,1 - 0,5
Kalsium (mg/dl)	9,8 - 12,0	9,8 - 12,0	9,8 - 12,0	9,8 - 12,0
Klorida (mEq/l)	97 - 105	97 - 105	97 - 105	97 - 105
Kolesterol total (mg/dl)	50 - 85	50 - 100	70 - 140	60 - 150
Creatinin (mg/dl)	0,3 - 0,8	0,3 - 0,9	0,3 - 1,0	0,4 - 0,8
Gamma-GT (IU/l)	0 - 2	0 - 2	0 - 3	0 - 5
Glukosa (mg/dl)	90 - 175	100 - 175	100 - 200	100 - 200
LDH (IU/l)	50 - 400	50 - 400	50 - 500	-
Fosfor anorganik (mg/dl)	7,0 - 10,0	4,0 - 8,5	4,0 - 8,0	3,5 - 7,0
Kalium (mEq/l)	5,5 - 8,0	4,0 - 7,0	4,0 - 7,0	4,0 - 7,0
Total protein (g/dl)	6,2 - 7,6 (M) 6,3 - 8,3 (F)	6,2 - 7,8 (M) 6,5 - 8,5 (F)	6,2 - 8,0 (M) 7,0 - 9,0 (F)	6,0 - 8,0 (M) 6,5 - 8,5 (F)
Natrium (mEq/l)	140 - 153	140 - 153	140 - 153	140 - 153
Sorbitol dehydrogenase (IU/l)	10 - 30	10 - 30	10 - 30	-
Trigliserida (mg/dl)	50 - 125	50 - 200	50 - 200	50 - 300
BUN (mg/dl)	12 - 18	12 - 20	12 - 20	12 - 18

Tabel 6. Tikus

(Villano and Sharp, 2012)

Parameter (satuan)	Rentang Nilai
ALT (IU/l)	52-224
Albumin (g/dl)	2,9 - 5,9
Alkalin fosfatase (IU/l)	-
AST (IU/l)	-
Asam empedu (µmol/l)	-
Total bilirubin (mg/dl)	0,0 - 0,64
Kalsium (mg/dl)	9,1 - 15,1
Klorida (mEq/l)	84 - 110
Kolesterol total (mg/dl)	-
Creatinin (mg/dl)	0,4 - 1,4
Glukosa (mg/dl)	80 - 300
LDH (IU/l)	-
Fosfor anorganik (mg/dl)	4,7 - 16
Kalium (mEq/l)	3,6 - 9,2
Total protein (g/dl)	4,5 - 8,4

Natrium (mEq/l)	142 - 154
Trigliserida (mg/dl)	50 - 125
BUN (mg/dl)	11 - 23

Tabel 7. Tikus UCFM Sprague-Dawley
(Delwatta SL, Gunatilake M, Baumans V, et al, 2018)

Parameter (satuan)	Rentang Nilai	
	Jantan	Betina
ALT (IU/l)	1 - 223,3	2,1 426,9
AST (IU/l)	0,2 - 838,3	20,8 - 470,2
Asam empedu (µmol/l)	-	-
Total bilirubin (mg/dl)	-	-
Kolesterol total (mg/dl)	14,4 - 81,7	20,4 - 87,6
Creatinin (mg/dl)	0,2 - 1,2	0,2 - 1,2
Glukosa (mg/dl)	62,4 - 201,8	56,1 - 197,2
HDL (mg/dl)	9,7 - 42,1	0,2 - 63,3
Total protein (g/dl)	-	-
Trigliserida (mg/dl)	2,7 - 47,8	8,7 - 60,7
BUN (mg/dl)	17,26 - 45,12	12,33 - 77,6

b. Parameter hematologi

Tabel 8. Mencit galur BALB/c
(Darelanko, Michael J, Auletta, Carol S, 2014)

Parameter (satuan)	Umur 1-3 Bulan	Umur 6-12 Bulan
Jumlah eritrosit (10⁶/mm³)	8,5 - 10,5	8,8 - 10,6
Hematokrit (%)	42,5 - 47,9	38,3 - 46,9
Hemoglobin (g/dl)	14,5 - 16,8	14,2 - 17,0
Jumlah leukosit (10³/mm³)	2,0 - 5,7	2,0 - 5,0
MCH (pg)	15,8 - 18,4	15,1 - 17,5
MCHC (g/dl)	34,2 - 38,1	35,1 - 40,6
MCV (fl)	46,3 - 50,3	40,9 - 45,9
Jumlah platelet (10³/mm³)	-	-

Tabel 9. Tikus galur Sprague Dawley
(Darelanko, Michael J, Auletta, Carol S, 2014)

Parameter (satuan)	Umur 10-12 Minggu	Umur 18-20 Minggu	Umur 32-34 Minggu	Umur 58-60 Minggu
Jumlah eritrosit (10⁶/mm³)	6,8 - 8,5 (M)	7,0 - 9,8 (M)	7,0 - 9,6 (M)	7,0 - 9,2 (M)
	7,0 - 8,2 (F)	6,5 - 9,2 (F)	6,5 - 8,8 (F)	6,5 - 8,5 (F)
Hematokrit (%)	40,0 - 48,0	36,0 - 52,0	36,0 - 50,0	38,0 - 48,0
Hemoglobin (g/dl)	14,0 - 17,0	14,0 - 17,0	14,0 - 17,0	14,0 - 17,0
Jumlah leukosit (10³/mm³)	6,0 - 18,0 (M)	6,0 - 19,0 (M)	6,0 - 18,0 (M)	5,0 - 15,0 (M)
	4,0 - 14,0 (F)	5,0 - 14,0 (F)	4,0 - 11,0 (F)	3,0 - 9,0 (F)

MCH (pg)	19,0 – 22,0	16,0 – 20,0	17,0 – 21,0	16,0 – 21,0
MCHC (g/dl)	33,0 – 38,0	31,0 – 38,0	31,0 – 38,0	32,0 – 38,0
MCV (fl)	53,0 – 63,0	50,0 – 60,0	45,0 – 60,0	46,0 – 58,0
Methemoglobin (% Hb)	0,4 – 1,2	0,4 – 1,2	0,4 – 1,2	-
Jumlah platelet (10³/mm³)	900 - 1300	800 - 1200	700 - 1200	700 - 1200
PT (s)	9,0 – 14,0	9,0 – 14,0	10,0 – 14,0	10,0 – 14,0

Tabel 10. Tikus
(Villano and Sharp, 2012)

Parameter (satuan)	Rentang Nilai
Jumlah eritrosit (10⁶/mm³)	5 - 10
Hematokrit (%)	35 - 57
Hemoglobin (g/dl)	11 - 19
Jumlah leukosit (10³/mm³)	3 - 17
MCH (pg)	18 - 23
MCHC (g/dl)	31 - 40
MCV (fl)	46 - 65
Methemoglobin (% Hb)	-
Jumlah platelet (10³/mm³)	200 - 1500
PT (s)	15,7 – 25, 4

Tabel 11. Tikus UCFM *Sprague-Dawley*
(Delwatta SL, Gunatilake M, Baumans V, et al, 2018)

Parameter (satuan)	Rentang Nilai	
	Jantan	Betina
Jumlah eritrosit (10⁶/mm³)	3,8 – 6,68	2,9 – 6,8
Hematokrit (%)	18 - 48	10 - 47
Hemoglobin (g/dl)	10,4 – 16,5	8,6 – 15,38
Jumlah leukosit (10³/mm³)	4,4 -14,8	3,6 – 14,5
MCH (pg)	18,37- 36,98	13,07 - 41,57
MCHC (g/dl)	25,41- 80,55	21,16- 95,0
MCV (fl)	29,41- 123,07	15,15 -119,44
Methemoglobin (% Hb)	-	-
Jumlah platelet (10³/mm³)	170 - 557	148 - 615
PT (s)	-	-

Catatan: -, data tidak tersedia
M, jantan
F, betina

O. CARA MENGORBANKAN HEWAN UJI

Kematian hewan tidak dipersyaratkan sebagai parameter akhir yang mutlak harus dicapai hewan dalam uji toksisitas. Hewan yang menunjukkan indikasi rasa nyeri, sakit dan distress dapat dikorbankan lebih dini (tanpa menunggu kematian) sesuai prinsip kesejahteraan hewan (*humane endpoint*). Pedoman OECD *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations* (2000) dapat digunakan sebagai acuan menentukan kondisi tersebut. Hewan yang dikorbankan dalam kondisi tersebut dihitung sebagai hewan mati yang berkaitan dengan pemberian sediaan uji.

Ada beberapa cara mengorbankan hewan uji (eutanasia) pada uji toksisitas; pada prinsipnya hewan uji dikorbankan sesuai dengan kaidah-kaidah cara dan teknik pengorbanan hewan sesuai dengan *Ethical Principle Deklarasi Helsinki* dan *American Veterinary Medical Association* (2020) serta tidak mempengaruhi hasil uji toksisitas.

1. Prinsip Eutanasia

Sebelum hewan uji dikorbankan, dilakukan anestesi terlebih dahulu. Hewan dipegang secara hati-hati tanpa menimbulkan rasa takut, lalu hewan dikorbankan dengan salah satu teknik di tempat terpisah dari hewan lain, dan dijaga agar tidak ada hewan hidup disekitarnya. Eutanasia harus dilakukan oleh personil yang kompeten, dan disertai proses konfirmasi untuk memastikan kematian.

2. Beberapa teknik mengorbankan hewan uji yang dapat digunakan, antara lain:

- a. Cara dislokasi leher untuk hewan kecil seperti mencit dan tikus dengan berat badan kurang dari 200 gram.
- b. Cara anestesi secara inhalasi dengan obat bius *halogenated* (seperti halotan, isofluran, sevofluran) atau CO₂ (menggunakan *chamber* khusus). Penggunaan eter untuk anestesi dan eutanasia sudah tidak direkomendasikan.
- c. Cara anestesi dengan metode penyuntikan. Metode dengan penyuntikan obat bius dapat dilakukan menggunakan dosis yang disarankan untuk

eutanasia (dosis letal) misalnya dengan ketamine dan xylazine, urethane atau pentobarbital.

- d. Cara pengeluaran darah (eksanguinasi) melalui vena jugularis atau arteri karotis yang sebelumnya dianestesi terlebih dahulu.

Pada malam sebelum hari dimana hewan akan dikorbankan, hewan dipuasakan terlebih dahulu sebelum pemeriksaan hematologi, biokimia dan urinalisis.

P. PEMUSNAHAN HEWAN UJI

Cara yang dipilih harus didasarkan pada kondisi tempat dan kapasitas tempat pemusnahan, serta cara tercepat memperoleh hasil dan kondisi yang dibutuhkan untuk menghilangkan agen penyebab penyakit. Metode yang umum digunakan untuk pemusnahan hewan mati adalah:

1. *Rendering*

Proses *render* merupakan penghancuran jaringan hewan uji secara mekanik dan pemanasan. Secara umum proses *rendering* meliputi penghancuran dan penggilingan jaringan diikuti dengan pemanasan dan tekanan tinggi. Proses *rendering* jaringan menghasilkan produk yang dapat bermanfaat misalnya lemak dan protein yang steril. Proses *rendering* tidak dapat membunuh penyakit prion (misalnya *Bovine Spongiform Encephalopathy* (BSE)).

2. Insinerasi (Pembakaran)

Teknik pembakaran diantaranya pirolisis, gasifikasi atau bentuk lain dari hasil pemanasan, dan dengan penghancuran karkas secara utuh menjadi abu. Tempat pembakaran permanen memiliki saluran pembuangan gas yang memiliki beberapa manfaat dilihat dari sudut pandang lingkungan. Saluran pembuangan gas terhubung dengan ruang pasca pembakaran yang berguna untuk membakar gas hidrokarbon dan partikel-partikel dari ruang pembakaran utama.

3. Penguburan

Pada metode ini seluruh bangkai dikubur dalam tanah dengan kedalaman yang aman dari risiko penggalian antara lain oleh hewan liar di sekitar lokasi penguburan. Penguburan tidak dapat menginaktivasi seluruh patogen-patogen. Prosedur ini tidak memerlukan transportasi tambahan karena dapat dilakukan pada lokasi penelitian dan penyebaran penyakit lebih terkendali. Namun diperlukan kontrol lingkungan karena prosedur ini berpotensi mengkontaminasi air tanah dan diperlukan pengendalian terhadap kemungkinan penggalian oleh hewan liar yang dapat membahayakan lingkungan.

Q. ANALISIS DATA

Data yang diperoleh pada uji toksisitas dianalisis dengan metode statistik yang sesuai.

R. PELAPORAN

Setiap data atau informasi yang diperoleh harus dicatat serta di dokumentasikan secara rinci dan sistematis. Data yang dicantumkan di dalam laporan harus sesuai dengan cara yang telah ditetapkan di dalam masing-masing pedoman uji.

BAB III

UJI TOKSISITAS PRAKLINIK SECARA IN VIVO

Uji toksisitas adalah suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis-respon yang khas dari sediaan uji. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberi informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji tersebut bila terjadi paparan pada manusia, sehingga dapat ditentukan dosis penggunaannya demi keamanan manusia.

Uji toksisitas menggunakan hewan uji sebagai model berguna untuk melihat adanya reaksi biokimia, fisiologik dan patologik pada manusia terhadap suatu sediaan uji. Hasil uji toksisitas tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan suatu bahan/sediaan pada manusia, namun dapat memberikan petunjuk adanya toksisitas relatif dan membantu identifikasi efek toksik bila terjadi paparan pada manusia.

Faktor-faktor yang menentukan validitas dari hasil uji toksisitas secara in vivo adalah: pemilihan spesies hewan uji, galur dan jumlah hewan; umur dan berat badan hewan; jenis kelamin hewan; cara pemberian sediaan uji; pemilihan dosis uji; efek samping sediaan uji; teknik dan prosedur pengujian termasuk cara penanganan hewan selama percobaan.

A. UJI TOKSISITAS AKUT ORAL

Uji toksisitas akut oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji yang diberikan secara oral dalam dosis tunggal, atau dosis berulang yang diberikan dalam waktu 24 jam.

Prinsip uji toksisitas akut oral yaitu, sediaan uji umumnya dalam beberapa tingkat dosis diberikan pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok, kemudian dilakukan pengamatan terhadap adanya efek toksik dan kematian. Hewan yang dikorbankan karena sekarat (menunjukkan indikasi rasa nyeri, sakit dan distres) dihitung sebagai hewan mati yang berkaitan dengan pemberian sediaan uji. Hewan yang mati selama percobaan

dan yang hidup sampai akhir percobaan dinekropsi untuk dievaluasi adanya gejala-gejala toksisitas.

Tujuan uji toksisitas akut oral adalah untuk mendeteksi toksisitas intrinsik suatu zat, menentukan organ sasaran, kepekaan spesies, memperoleh informasi bahaya setelah paparan suatu zat secara akut, memperoleh informasi awal yang dapat digunakan untuk menetapkan tingkat dosis, merancang uji toksisitas selanjutnya, memperoleh nilai LD₅₀ suatu bahan/sediaan, serta penentuan penggolongan bahan/sediaan dan pelabelan.

Uji toksisitas akut dengan menggunakan hewan percobaan diperlukan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian suatu zat dalam dosis tunggal atau dosis berulang yang diberikan dalam waktu tidak lebih dari 24 jam; apabila pemberian dilakukan secara berulang, maka interval waktu tidak kurang dari 3 jam.

Tabel 12. Kriteria penggolongan sediaan uji menurut OECD (pada tikus*)

Dosis (mg/kg berat badan)	Kematian	Kategori
5	≥ 2 dari 5 ekor mati	1
5	≥1 ekor menunjukkan gejala toksisitas dan tidak ada kematian	2
50	≥ 2 dari 5 ekor mati	
50	≥1 ekor dengan gejala toksisitas dan tidak ada kematian	3
300	≥ 2 dari 5 ekor mati	
300	≥1 ekor dengan gejala toksisitas dan atau <1 mati	4
2000	≥ 2 dari 5 ekor mati	
2000	≥1 ekor dengan gejala toksisitas dan atau tidak ada kematian	5
	Tidak ada gejala toksisitas	

*) Tabel ini berlaku juga untuk pengujian pada mencit.

Hasil toksisitas akut dievaluasi berdasarkan kriteria bahaya dari GHS (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*) yang tercantum dalam *Thirteenth Addendum to The OECD Guidelines for The Testing of Chemicals* (2001), seperti Tabel 12 ini. Kriteria penggolongan menurut OECD (2001) digunakan untuk penentuan kategori toksisitas akut

bahan kimia seperti pestisida serta untuk pelabelannya.

Sedangkan untuk Obat, Obat Tradisional, Suplemen Kesehatan, bahan lainnya (*Generally Recognized As Safe/GRAS*) seperti bahan pangan, penentuan kategori toksisitas akut digunakan penggolongan klasifikasi seperti pada Tabel 13.

Tabel 13. Kriteria penggolongan sediaan uji

Tingkat Toksisitas	LD₅₀ oral (pada tikus*)	Klasifikasi
1	≤ 5 mg/kg	Super Toksik
2	5-50 mg/kg	Sangat Toksik
3	>50-500 mg/kg	Toksik
4	>500-2000 mg/kg	Toksik Sedang
5	>2000-5000 mg/kg	Toksik Ringan
6	>5000 mg/kg	Tidak Toksik

(Hodge dan Sterner, 1995 dengan modifikasi)

*) Tabel ini berlaku juga untuk pengujian pada mencit.

1. PRINSIP

Prinsip toksisitas akut yaitu pemberian secara oral suatu zat dalam beberapa tingkatan dosis kepada beberapa kelompok hewan uji. Penilaian toksisitas akut ditentukan dari gejala toksisitas yang timbul dan kematian hewan uji sebagai parameter akhir. Hewan yang menunjukkan indikasi rasa nyeri, sakit dan *distress* dapat dikorbankan lebih dini (tanpa menunggu kematian) sesuai prinsip kesejahteraan hewan (*humane endpoint*). Hewan yang dikorbankan dalam kondisi tersebut dihitung sebagai hewan mati yang berkaitan dengan pemberian sediaan uji. Hewan yang mati selama percobaan dan yang hidup sampai akhir percobaan dinekropsi untuk dievaluasi adanya gejala-gejala toksisitas dan selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ.

2. TUJUAN

Tujuan uji toksisitas akut adalah untuk mengidentifikasi bahan kimia yang toksik dan memperoleh informasi tentang bahaya terhadap manusia bila terpajan. Uji toksisitas akut digunakan untuk menetapkan nilai LD₅₀ suatu zat.

3. METODE UJI TOKSISITAS AKUT

Pada awalnya toksisitas akut diuji menggunakan metode konvensional, namun metode ini mempunyai kelemahan yaitu hewan uji yang dibutuhkan dalam menentukan parameter akhir cukup banyak, dimana bertentangan dengan *animal welfare*. Oleh karena itu pada tahun 1984 telah dibuat metode alternatif dimana hewan yang digunakan jumlahnya lebih sedikit yaitu metode *Up and Down Procedure, Fixed Dose Method dan Acute Toxic Class Method*.

Metode Alternatif merupakan revisi metode OECD tahun 1984 disebabkan adanya kesepakatan untuk mendapatkan jalan pintas dalam mengklasifikasikan senyawa kimia. Pada metode alternatif, hanya menggunakan satu jenis kelamin hewan uji. Hal ini disebabkan karena dari literatur tidak ada perbedaan nilai LD₅₀ yang signifikan akibat perbedaan jenis kelamin, tetapi pada keadaan yang berbeda nilai LD₅₀ umumnya jenis kelamin betina lebih sensitif, maka pada uji alternatif hanya menggunakan hewan betina. Jumlah hewan yang digunakan pada uji alternatif lebih sedikit dibandingkan dengan metode konvensional. Dalam pedoman ini akan dibahas uji toksisitas akut metode *Fixed Dose Method, Acute Toxic Class Method dan Up and Down Procedure Method*.

3.a. FIXED DOSE METHOD

Metode ini digunakan untuk bahan uji dengan derajat toksisitas sedang dan dosis yang dipilih adalah yang tidak menimbulkan kematian, nyeri hebat atau iritatif/ korosif.

3.a.1. PRINSIP

Sekelompok hewan uji dengan jenis kelamin yang sama diberikan dosis bertingkat menggunakan metode *fixed doses* antara lain: 5, 50, 300 dan

2000 mg/kg berat badan (dosis dapat ditambah hingga 5000 mg/kg berat badan). Dosis awal dipilih berdasarkan uji pendahuluan sebagai dosis yang dapat menimbulkan gejala toksisitas ringan tetapi tidak menimbulkan efek toksik yang berat atau kematian. Prosedur ini dilanjutkan hingga mencapai dosis yang menimbulkan efek toksik atau ditemukan tidak lebih dari 1 kematian, atau tidak tampak efek toksik hingga dosis yang tertinggi atau adanya kematian pada dosis yang lebih rendah.

3.a.2. PROSEDUR

3.a.2.1. Penyiapan Hewan Uji

Hewan yang digunakan adalah rodensia tikus putih (galur *Sprague Dawley* atau *Wistar*) atau mencit (galur *ddY* atau *BALB/c* dan lain-lainnya). Umumnya digunakan hewan betina karena sedikit lebih sensitif dibandingkan hewan jantan. Namun bila bahan uji (menurut literatur) secara toksikologi atau toksikokinetik menunjukkan bahwa hewan jantan lebih sensitif, maka jenis kelamin jantan harus digunakan untuk uji. Secara prinsip jika hewan jantan digunakan maka diperlukan alasan yang kuat.

Kriteria hewan uji meliputi:

- a. Hewan sehat dan dewasa
- b. Hewan betina harus yang belum pernah beranak dan tidak sedang bunting.
- c. Pada saat akan diberikan dosis uji, setiap hewan harus berumur 8-12 minggu dengan variasi berat badan tidak boleh melebihi 20% dari rata-rata berat badan.

Hewan diseleksi secara acak, diberi tanda untuk identifikasi tiap-tiap hewan, dan dilakukan aklimatisasi 5-7 hari sebelum diberi perlakuan.

3.a.2.2. Penyiapan Sediaan Uji

Sediaan uji dilarutkan dengan bahan pembawa yang sesuai (misalnya aqua destilata, minyak nabati). Tergantung dari formulasi bahan uji, pemilihan cairan untuk suspensi/emulsi yang larut air (*aqueous*) lebih dianjurkan

daripada larutan suspensi/emulsi yang larut dalam minyak (minyak jagung) dan apabila menggunakan pelarut yang tidak larut air (*non aqueous*) maka karakteristik toksisitas cairan pembawa sudah harus diketahui.

3.a.2.3. Pemberian Sediaan uji dan Volume Pemberian

Hewan uji harus dipuasakan sebelum diberikan perlakuan (tikus dipuasakan selama 14-18 jam, namun air minum boleh diberikan; mencit dipuasakan selama 3-4 jam, air minum boleh diberikan). Setelah dipuasakan, hewan ditimbang dan diberikan sediaan uji. Sediaan uji diberikan dalam dosis tunggal dengan menggunakan sonde. Pada keadaan yang tidak memungkinkan untuk diberikan dosis dengan satu kali pemberian, sediaan uji dapat diberikan beberapa kali dalam jangka waktu pemberian zat tidak boleh melampaui 24 jam. Setelah diberikan perlakuan, pakan boleh diberikan kembali setelah 3-4 jam untuk tikus dan 1-2 jam untuk mencit. Bila sediaan uji diberikan beberapa kali, maka pakan boleh diberikan setelah perlakuan tergantung pada lama periode pemberian sediaan uji tersebut.

Volume cairan maksimal yang dapat diberikan tergantung pada ukuran (berat badan) setiap hewan uji. Pada rodensia, jumlah normalnya tidak melampaui 1 mL/100 g berat badan, namun bila pelarutnya air (*aqueous*) dapat diberikan hingga 2 mL/100 g berat badan. Bila pelarutnya air (*aqueous*), pada tikus dengan berat badan >250 gram, batas volume maksimal yang dapat diberikan adalah 5 mL, dan pada mencit dengan berat badan >50 gram, batas volume maksimal yang dapat diberikan adalah 1 mL. Umumnya sediaan uji diberikan dalam volume yang tetap selama pengujian (konsentrasi berbeda), akan tetapi jika bahan uji berupa cairan atau campuran cairan, sebaiknya digunakan dalam bentuk tidak diencerkan (konsentrasi tetap).

3.a.2.4. Uji Pendahuluan

Tujuan dari uji pendahuluan adalah mencari dosis awal yang sesuai untuk uji utama. Dosis awal pada uji pendahuluan dapat dipilih dari tingkatan

fixed dose: 5, 50, 300 dan 2000 mg/kg berat badan sebagai dosis yang diharapkan dapat menimbulkan efek toksik sesuai dengan bagan uji pendahuluan sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf A dan B. Pemeriksaan menggunakan dosis 5000 mg/kg berat badan hanya dilakukan bila benar-benar diperlukan. Diperlukan informasi tambahan yaitu data-data toksisitas in vivo dan in vitro dari zat-zat yang mempunyai kesamaan secara kimiawi dan struktur. Jika informasi tersebut tidak ada, maka dosis awalnya ditentukan sebesar 300 mg/kg berat badan. Interval waktu pengamatan sekurang-kurangnya 24 jam pada setiap dosis dan semua hewan harus diamati sekurang-kurangnya selama 14 hari.

Bila kematian terjadi pada dosis 5 mg/kg berat badan, sehingga nilai *cut-off* LD₅₀ adalah 5 mg/kg berat badan (masuk kategori 1 GHS) maka penelitian sudah harus dihentikan tanpa perlu melakukan uji utama. Namun, jika diperlukan penegasan nilai LD₅₀ maka prosedur tambahan dapat dilakukan sebagai berikut: Pada hewan uji kedua diberikan dosis 5 mg/kg berat badan. Jika hewan kedua ini mati, maka kategori 1 GHS terkonfirmasi dan percobaan dihentikan. Jika hewan ini hidup, maka pemberian bahan uji dosis 5 mg/kg berat badan secara berurutan dilanjutkan kepada 3 hewan uji lainnya. Interval waktu pemberian antara satu hewan dengan hewan berikutnya harus cukup agar dapat dilakukan penilaian apakah hewan tersebut akan tetap hidup atau tidak. Jika hewan ke-3 mati (jika dihitung dari awal merupakan kematian kedua hewan uji), maka pemberian bahan uji dihentikan dan tidak diteruskan kepada hewan ke-4 dan ke-5. Sesuai dengan bagan uji pendahuluan dengan *starting dose* 300 dan 2000 mg/kg berat badan pada uji *Fixed Dose Procedure Method* sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf B, maka bahan uji masuk kelompok A (kematian 2 atau lebih), dan berlaku klasifikasi pada dosis 5 mg/kg berat badan (Kategori 1 jika ada 2 atau lebih kematian atau Kategori 2 jika hanya ada 1 kematian).

3.a.2.5. Uji Utama

Uji utama dilakukan dengan memperhatikan tingkat dosis dimana terjadi kematian pada uji pendahuluan. Penentuan dosis antara setiap tingkatan

didasarkan pada waktu terjadinya gejala toksik. Pengujian tidak diteruskan pada dosis selanjutnya sampai diketahui apakah hewan masih bertahan hidup atau mati sesuai dengan bagan uji utama sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf C dan D. Secara umum terdapat 3 pilihan yang akan diambil: menghentikan uji, melanjutkan uji dengan dosis yang lebih tinggi atau melanjutkan uji dengan dosis yang lebih rendah. Pada umumnya, klasifikasi bahan uji sudah dapat ditentukan pada dosis awal dan uji selanjutnya tidak diperlukan. Pada uji ini diperlukan sejumlah 5 ekor hewan uji untuk tiap tahapan dosis uji. Kelima ekor hewan tersebut terdiri atas 1 ekor hewan dari uji pendahuluan dan 4 ekor hewan tambahan. Interval waktu antara dosis uji ditentukan oleh *onset*, lama dan beratnya toksisitas. Peralihan pemberian bahan uji pada tahap dosis berikutnya harus ditunda sampai diperoleh petunjuk bahwa hewan uji tersebut bertahan hidup. Umumnya diperlukan interval waktu peralihan selama 3-4 hari, namun dapat diperpanjang bila hasilnya tampak meragukan. Pemeriksaan menggunakan dosis 5000 mg/kg berat badan hanya dilakukan bila benar-benar diperlukan. Sehubungan dengan *animal welfare*, bila akan menggunakan dosis diatas 5000 mg/kg berat badan, dipertimbangkan bahwa dosis tersebut sangat relevan dengan kepentingan untuk melindungi manusia, hewan atau lingkungan.

3.a.2.6. Uji Batas

Jika pada uji pendahuluan tidak ada kematian pada tingkat dosis 2000 mg/kg berat badan dan pada uji utama hanya 1 ekor atau tidak ada hewan yang mati pada tingkat dosis 2000 mg/kg berat badan, maka tidak perlu diberikan dosis melampaui 2000 mg/kg berat badan. Penetapan uji batas ditetapkan berdasarkan kajian terhadap bahan dan produk. Pada uji untuk obat tradisional apabila berdasarkan kajian terhadap bahan dan produk memiliki justifikasi untuk dilakukan uji batas pada dosis 5000 mg/kg berat badan maka dapat dilakukan uji batas pada dosis tersebut dan pada dosis 2000 mg/kg berat badan.

3.a.2.7. Pengamatan

Hewan uji diobservasi secara individual sekurang-kurangnya pada 30 menit pertama setelah pemberian sediaan uji, dan secara periodik setiap 4 jam selama 24 jam pertama dan sehari sekali setelah itu selama 14 hari. Namun durasi pengamatan dapat bervariasi dan diperpanjang tergantung dari reaksi toksik dan waktu *onset* serta lama waktu kesembuhan. Waktu timbul dan hilangnya gejala toksisitas (khususnya jika ada kecenderungan tanda-tanda toksik yang tertunda) harus dicatat secara sistematis dalam catatan individual yang dilakukan untuk setiap hewan.

Pengamatan tambahan perlu dilakukan jika hewan menunjukkan gejala toksisitas secara terus-menerus. Pengamatan yang dilakukan termasuk pada: kulit, bulu, mata, membran mukosa dan juga sistem pernafasan, sistem saraf otonom, sistem saraf pusat, aktivitas somatomotor serta tingkah laku. Selain itu, perlu juga pengamatan pada kondisi: gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, tidur dan koma. Hewan dalam kondisi sekarat dan hewan yang menunjukkan gejala nyeri yang berat atau tampak menderita harus dikorbankan. Hewan uji yang dikorbankan atau ditemukan mati, waktu kematiannya harus dicatat. Hal-hal yang harus diamati dalam periode observasi adalah:

- a. Tingkah laku hewan seperti jalan mundur, jalan menggunakan perut
- b. Berat Badan

Berat badan masing-masing hewan harus dimonitor pada saat sebelum diberikan sediaan uji dan sekurang-kurangnya seminggu setelahnya. Perubahan berat badan harus dianalisis. Pada akhir penelitian, hewan yang masih bertahan hidup ditimbang dan kemudian dikorbankan.

- c. Pemeriksaan Patologi

Seluruh hewan (termasuk yang mati selama penelitian maupun yang dimatikan) harus dinekropsi. Semua perubahan *gross* patologi dicatat untuk setiap hewan uji. Pemeriksaan mikroskopik (histopatologi) dari organ yang menunjukkan adanya perubahan secara *gross* patologi pada hewan yang bertahan hidup selama 24 jam atau lebih setelah pemberian dosis awal dapat dilakukan untuk mendapatkan informasi yang berguna.

3.a.2.8. Pengumpulan dan Analisis Data

Data masing-masing hewan harus tersedia dan semua data harus diringkas dalam bentuk tabel yang menunjukkan dosis uji yang digunakan; jumlah hewan yang menunjukkan gejala toksisitas; jumlah hewan yang ditemukan mati selama uji dan yang mati karena dikorbankan; waktu kematian masing-masing hewan; gambaran dampak toksik dan waktu dampak toksik; waktu terjadinya reaksi kesembuhan; dan penemuan nekropsi.

3.a.3 PELAPORAN HASIL PENGUJIAN

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Metode
 - a. Jenis hewan, jumlah dan galur yang digunakan;
 - b. Nama, bentuk, kemurnian dan cara pemberian sediaan uji;
 - c. Zat pembawa: air atau zat lainnya ;
 - d. Kondisi pemeliharaan hewan: ukuran kandang, jumlah hewan perkandang, bahan pembuat kandang (aluminium, fiber atau bahan lain);
 - e. Kondisi pengujian: pemilihan dosis awal, formulasi sediaan uji, dosis dan volume sediaan uji serta waktu pemberian.
3. Hasil:
 - a. Data pengamatan;
 - b. Efek toksik yang terjadi untuk setiap dosis dan jenis kelamin;
 - c. Waktu terjadinya gejala-gejala toksik, tingkah laku hewan dan kematian;
 - d. Data berat badan;
 - e. Penemuan hasil pemeriksaan makropatologi dan histopatologi (bila diperlukan);
 - f. Data LD₅₀.
4. Pembahasan
5. Kesimpulan dan saran
6. Daftar Pustaka

3.b. ACUTE TOXIC CLASS METHOD

Metode ini tidak ditujukan untuk menghitung nilai pasti LD₅₀ tetapi untuk penentuan rentang paparan dimana kematian diperkirakan terjadi karena proporsi kematian hewan masih merupakan *endpoint* utama dari penelitian ini. Metode ini memungkinkan penentuan nilai LD₅₀ hanya ketika setidaknya dua dosis mengakibatkan kematian lebih tinggi dari 0% dan lebih rendah dari 100%.

3.b.1. PRINSIP

Pengujian ini memiliki prinsip prosedur bertahap dengan menggunakan jumlah hewan paling minimal pada tiap tahapnya. Sediaan uji diberikan secara oral ke hewan uji pada dosis tertentu. Sediaan uji digunakan dengan prosedur bertahap, dimana tiap tahap menggunakan 3 hewan uji (jenis kelamin hanya satu, umumnya betina). Ada atau tidak adanya kejadian mortalitas hewan uji yang berkaitan dengan bahan uji akan menentukan tahap berikutnya, seperti:

- Tidak diperlukan pengujian lanjutan
- Ditambahkan tiga hewan uji dengan dosis bahan uji sama dengan yang sebelumnya
- Ditambahkan tiga hewan uji dengan dosis bahan uji lebih tinggi atau lebih rendah dari yang sebelumnya

Metode ini akan dapat menjadi dasar klasifikasi bahan uji menurut klasifikasi toksisitas yang ditentukan oleh *fixed LD-50 cut-off value*.

3.b.2. PROSEDUR

3.b.2.1. Penyiapan Hewan Uji

Hewan rodensia yang lebih dipilih digunakan adalah tikus, meskipun spesies rodensia lain dapat digunakan. Umumnya menggunakan tikus betina, karena sedikit lebih sensitif dibandingkan tikus jantan. Namun bila bahan uji (menurut literatur) secara toksikologi atau toksikokinetik menunjukkan bahwa tikus jantan lebih sensitif, maka jenis kelamin jantan harus digunakan untuk uji. Secara prinsip jika hewan jantan digunakan maka diperlukan alasan yang kuat.

Kriteria hewan uji meliputi:

- a. Hewan sehat dan dewasa
- b. Hewan betina harus yang belum pernah beranak dan tidak sedang bunting.
- c. Pada saat akan diberikan dosis uji, setiap hewan harus berumur 8-12 minggu dengan variasi berat badan tidak boleh melebihi 20% dari rata-rata berat badan.

Hewan diseleksi secara acak, diberi tanda untuk identifikasi tiap-tiap hewan, dan dilakukan aklimatisasi 5-7 hari sebelum diberi perlakuan.

3.b.2.2. Penyiapan Sediaan Uji

Sediaan uji dilarutkan dengan bahan pembawa yang sesuai (misalnya aquadestilata, minyak nabati). Tergantung dari formulasi bahan uji, pemilihan air untuk pelarut suspensi/emulsi lebih dianjurkan daripada larutan suspensi/emulsi yang larut dalam minyak (minyak jagung) dan apabila menggunakan pelarut selain air maka karakteristik toksisitas cairan pembawa sudah harus diketahui

3.b.2.3. Pemberian Sediaan uji dan Volume Pemberian

Hewan uji harus dipuasakan sebelum diberikan perlakuan (tikus dipuasakan selama 14-18 jam, namun air minum boleh diberikan; mencit dipuasakan selama 3-4 jam, air minum boleh diberikan). Setelah dipuasakan, hewan ditimbang dan diberikan sediaan uji. Sediaan uji diberikan dalam dosis tunggal dengan menggunakan sonde. Pada keadaan yang tidak memungkinkan untuk diberikan dosis dengan satu kali pemberian, sediaan uji dapat diberikan beberapa kali dalam jangka waktu pemberian zat tidak boleh melampaui 24 jam. Setelah diberikan perlakuan, pakan boleh diberikan kembali setelah 3-4 jam untuk tikus dan 1-2 jam untuk mencit. Bila sediaan uji diberikan beberapa kali, maka pakan boleh diberikan setelah perlakuan tergantung pada lama periode pemberian sediaan uji tersebut.

Volume cairan maksimal yang dapat diberikan tergantung pada ukuran (berat badan) setiap hewan uji. Pada rodensia, jumlah normalnya tidak

melampaui 1 mL/100 g berat badan, namun bila pelarutnya air (*aqueous*) dapat diberikan hingga 2 mL/100 g berat badan. Bila pelarutnya air (*aqueous*), pada tikus dengan berat badan >250 gram, batas volume maksimal yang dapat diberikan adalah 5 mL, dan pada mencit dengan berat badan >50 gram, batas volume maksimal yang dapat diberikan adalah 1 mL. Umumnya sediaan uji diberikan dalam volume yang tetap selama pengujian (konsentrasi berbeda), akan tetapi jika bahan uji berupa cairan atau campuran cairan, sebaiknya digunakan dalam bentuk tidak diencerkan (konsentrasi tetap).

3.b.2.4. Prosedur Uji

Sebanyak tiga hewan digunakan untuk tiap tahapan dosis. Dosis awal yang umumnya digunakan dapat dipilih dari 4 dosis tingkatan dosis tetap: 5, 50, 300 dan 2000 mg/kg berat badan. Dosis awal sebaiknya merupakan tingkatan dosis yang kemungkinan besar akan menyebabkan kematian pada beberapa hewan sesuai dengan bagan uji sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf E - H yang menunjukkan prosedur yang harus diikuti untuk setiap dosis awal). Pada uji, perlu ditambahkan kelompok normal untuk membandingkan organnya.

Bila terdapat informasi awal yang menunjukkan bahwa kematian tidak muncul pada dosis tetap tertinggi (2000 mg/kg berat badan), maka harus dilakukan uji batas. Ketika tidak ada informasi terkait bahan uji, maka dosis awal yang direkomendasikan adalah 300 mg/kg berat badan mempertimbangkan kesejahteraan hewan uji.

Interval waktu antar kelompok ditentukan dari onset, durasi dan keparahan gejala toksisitas. Pemberian dosis selanjutnya harus ditunda hingga hasil yang sebelumnya telah diyakini dengan benar.

Pertimbangan penggunaan dosis tambahan di atas 5000 mg/kg berat badan hanya untuk kasus tertentu dan hanya bila terdapat justifikasi kebutuhan regulatori dapat dilakukan. Karena alasan kesejahteraan hewan, pengujian pada GHS kategori 5 (2000 – 5000 mg/kg berat badan)

tidak disarankan dan hanya dipertimbangkan dilakukan bila hasil penelitian tersebut memiliki relevansi langsung untuk melindungi kesehatan manusia atau hewan atau lingkungan.

Kriteria pengujian pada GHS kategori 5 ditujukan untuk dapat mengidentifikasi bahan uji yang memiliki toksisitas akut relatif rendah tetapi dalam keadaan tertentu dapat menimbulkan bahaya bagi populasi rentan. Bahan uji ini diperkirakan memiliki LD₅₀ oral atau dermal pada rentang 2000 – 5000 mg/kg berat badan atau dosis yang ekuivalen untuk rute pemberian lainnya. Bahan uji memenuhi kriteria sebagai berikut:

1. Bila diarahkan ke kategori ini sesuai skema pengujian pada uji utama, berdasarkan kejadian kematian hewan uji;
2. Bila telah tersedia bukti bahwa LD₅₀ berada pada rentang Kategori 5, atau studi hewan lainnya ataupun efek toksik pada manusia bersifat akut.
3. Melalui ekstrapolasi, estimasi atau pengukuran data jika dilakukan ke kategori lain yang lebih toksik tidak dijamin dan
 - Tersedia informasi terpercaya yang mengindikasikan signifikansi efek toksik di manusia, atau
 - Terjadi kematian yang diamati ketika diuji pada Kategori 4 dengan rute pemberian oral, atau
 - Terdapat penilaian dari para ahli yang mengkonfirmasi gejala klinis signifikan dari toksisitas, ketika diuji hingga Kategori 4, kecuali diare, piloereksi atau penampilan yang tidak terawat (*ungroomed appearance*), atau
 - Terdapat konfirmasi para ahli tentang adanya informasi yang terpercaya yang mengindikasikan potensi efek akut yang signifikan dari penelitian hewan lainnya.

3.b.2.5. Uji Batas

Uji batas dilakukan pada saat bahan uji diindikasikan bersifat nontoksik atau memiliki toksisitas diatas batas dosis yang ditentukan. Informasi terkait dengan toksisitas bahan uji dapat diperoleh dari senyawa lain yang mirip secara struktur atau campuran maupun produk yang mirip, dengan

mempertimbangkan identitas dan persentase komponen yang diketahui memiliki signifikansi toksikologi. Bila tidak terdapat informasi terkait toksisitas atau bahan uji diekspektasikan bersifat toksik, harus dilakukan uji utama.

Uji batas pada tingkatan dosis 2000 mg/kg berat badan dilakukan dengan enam hewan (masing-masing 3 hewan per langkah). Ketika diperlukan pengujian pada dosis 5000 mg/kg berat badan, hanya dibutuhkan satu tahap dengan 3 hewan. Bila hewan pertama mati, maka dosis berikutnya dilakukan pada 2000 mg/kg berat badan dan mengikuti diagram alir pada skema uji utama. Bila hewan pertama hidup, kedua hewan lainnya diberikan bahan uji. Bila salah satu dari ketiga hewan mati, nilai LD₅₀ diekspektasikan melebihi 5000 mg/kg berat badan. Bila kedua hewan mati, pemberian dosis dilanjutkan pada dosis 2000 mg/kg berat badan.

Penetapan uji batas ditetapkan berdasarkan kajian terhadap bahan dan produk. Pada uji untuk obat tradisional apabila berdasarkan kajian terhadap bahan dan produk memiliki justifikasi untuk dilakukan uji batas pada dosis 5000 mg/kg berat badan maka dapat dilakukan uji batas pada dosis tersebut dan pada dosis 2000 mg/kg berat badan.

3.b.2.6. Pengamatan

Hewan uji diobservasi secara individual sekurang-kurangnya pada 30 menit pertama setelah pemberian sediaan uji, dan secara periodik selama 4 jam pertama serta setelah 24 jam pemberian sediaan uji kemudian setiap hari setelah itu selama 14 hari. Namun durasi pengamatan dapat bervariasi dan diperpanjang tergantung dari reaksi toksik dan waktu *onset* serta lama waktu kesembuhan. Waktu timbul dan hilangnya gejala toksisitas (khususnya jika ada kecenderungan tanda-tanda toksik yang tertunda) harus dicatat secara sistematis dalam catatan individual yang dilakukan untuk setiap hewan.

Pengamatan tambahan perlu dilakukan jika hewan menunjukkan gejala toksisitas yang teramati berulang.

Hal-hal yang harus diamati dalam periode observasi adalah:

a. Kondisi dan tingkah laku hewan.

Pengamatan yang dilakukan termasuk pada: kulit, bulu, mata, membran mukosa dan juga sistem pernafasan, sistem saraf otonom, sistem saraf pusat, aktivitas somatomotor serta tingkah laku. Selain itu, perlu juga pengamatan pada kondisi: gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, tidur dan koma. Hewan dalam kondisi sekarat dan hewan yang menunjukkan gejala nyeri yang berat atau tampak menderita harus dikorbankan. Hewan uji yang dikorbankan atau ditemukan mati, waktu kematiannya harus dicatat.

b. Berat Badan

Berat badan masing-masing hewan harus dimonitor pada saat sebelum diberikan sediaan uji dan sekurang-kurangnya seminggu sekali. Perubahan berat badan harus dianalisis. Pada akhir penelitian, hewan yang masih bertahan hidup ditimbang dan kemudian dikorbankan.

c. Pemeriksaan Patologi

Seluruh hewan (termasuk yang mati selama penelitian maupun yang dimatikan) harus dinekropsi. Semua perubahan *gross* patologi dicatat untuk setiap hewan uji. Pemeriksaan mikroskopik (histopatologi) dari organ yang menunjukkan adanya perubahan secara *gross* patologi pada hewan yang bertahan hidup selama 24 jam atau lebih setelah pemberian dosis awal dapat dilakukan untuk mendapatkan informasi yang berguna.

3.b.2.7. Pengumpulan dan Analisis Data

Data masing-masing hewan harus tersedia dan semua data harus diringkas dalam bentuk tabel yang menunjukkan dosis uji yang digunakan; jumlah hewan yang menunjukkan gejala toksisitas; jumlah hewan yang ditemukan mati selama uji dan yang mati karena dikorbankan; waktu kematian masing-masing hewan; gambaran dampak toksik dan waktu dampak toksik; waktu terjadinya reaksi kesembuhan; dan temuan nekropsi.

3.b.3 PELAPORAN HASIL PENGUJIAN

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan

2. Metode

- a. Jenis hewan, jenis kelamin (termasuk alasan pemilihan jenis kelamin jantan dibanding betina), jumlah dan galur yang digunakan
- b. Nama, bentuk, kemurnian dan cara pemberian sediaan uji termasuk Nomor CAS jika ada
- c. Zat pembawa: air atau zat lainnya
- d. Kondisi pemeliharaan hewan: ukuran kandang, jumlah hewan perkandang, bahan pembuat kandang (aluminium, fiber atau bahan lain), jenis pakan dan minum yang digunakan.
- e. Kondisi pengujian: pemilihan dosis awal, formulasi sediaan uji, dosis dan volume sediaan uji serta waktu pemberian

3. Hasil:

- a. Data pengamatan
- b. Efek toksik yang terjadi untuk setiap dosis dan jenis kelamin
- c. Waktu terjadinya gejala-gejala toksik, tingkah laku hewan dan kematian
- d. Data berat badan
- e. Penemuan hasil pemeriksaan makropatologi dan histopatologi (bila diperlukan).
- f. Data LD₅₀

4. Pembahasan

5. Kesimpulan dan saran

6. Daftar Pustaka

3.c. METODE UP-AND-DOWN PROCEDURE

Metode ini umumnya digunakan untuk bahan uji yang dapat menyebabkan kematian dalam waktu satu atau dua hari. Metode ini tidak direkomendasikan digunakan pada sediaan uji dengan ekspektasi kejadian kematian 5 hari atau lebih.

3.c.1. PRINSIP

Pengujian utama terdiri dari pemberian dosis tunggal secara bertingkat dimana pada hewan uji pertama diberikan senyawa uji, satu dosis dalam

satu waktu dengan minimum interval 48 jam dari hewan berikutnya. Hewan uji pertama diberikan dosis satu tingkat lebih rendah dari dosis yang diestimasi sebagai LD₅₀. Bila hewan dapat bertahan hidup, dosis untuk hewan berikutnya dinaikkan dengan faktor 3,2 dari dosis awal; bila hewan mati, dosis pada hewan selanjutnya diturunkan dengan penurunan yang sama (Catatan : 3,2 merupakan faktor default yang sesuai dengan progresi dosis dari satu unit setengah log). Setiap hewan harus diamati dengan baik selama 48 jam sebelum membuat keputusan untuk dosis hewan berikutnya. Keputusan dosis didasarkan pada pola kelangsungan hidup 48 jam semua hewan. Pemberian dosis dihentikan bila salah satu kriteria penghentian studi (seperti yang tercantum dalam Uji Utama) telah terpenuhi dimana pada saat itu nilai estimasi LD₅₀ dan *confidence interval* dihitung berdasarkan status semua hewan saat penghentian. Pada sebagian besar studi dapat selesai dengan 4 hewan uji setelah pertama kali pembalikan dosis. LD₅₀ dihitung menggunakan metode kemungkinan maksimum.

3.c.2. PROSEDUR

3.c.2.1. Penyiapan Hewan Uji

Hewan rodensia yang lebih dipilih digunakan adalah tikus, meskipun spesies rodensia lain dapat digunakan. Umumnya menggunakan tikus betina, karena sedikit lebih sensitif dibandingkan tikus jantan. Namun bila bahan uji (menurut literatur) secara toksikologi atau toksikokinetik menunjukkan bahwa tikus jantan lebih sensitif, maka jenis kelamin jantan harus digunakan untuk uji. Secara prinsip jika hewan jantan digunakan maka diperlukan alasan yang kuat.

Kriteria hewan uji meliputi:

- a. Hewan sehat dan dewasa
- b. Hewan betina harus yang belum pernah beranak dan tidak sedang bunting.
- c. Pada saat akan diberikan dosis uji, setiap hewan harus berumur 8-12 minggu dengan variasi berat badan tidak boleh melebihi 20% dari rata-rata berat badan.

Hewan diseleksi secara acak, diberi tanda untuk identifikasi tiap-tiap hewan, dan dilakukan aklimatisasi 5-7 hari sebelum diberi perlakuan.

3.c.2.2. Penyiapan Sediaan Uji

Sediaan uji dilarutkan dengan bahan pembawa yang sesuai (misalnya aquadestilata, minyak nabati). Tergantung dari formulasi bahan uji, pemilihan air untuk pelarut suspensi/emulsi lebih dianjurkan daripada larutan suspensi/emulsi yang larut dalam minyak (minyak jagung) dan apabila menggunakan pelarut selain air maka karakteristik toksisitas cairan pembawa sudah harus diketahui.

3.c.2.3. Pemberian Sediaan uji dan Volume Pemberian

Hewan uji harus dipuasakan sebelum diberikan perlakuan (tikus dipuasakan selama 14-18 jam, namun air minum boleh diberikan; mencit dipuasakan selama 3-4 jam, air minum boleh diberikan). Setelah dipuasakan, hewan ditimbang dan diberikan sediaan uji. Sediaan uji diberikan dalam dosis tunggal dengan menggunakan sonde. Pada keadaan yang tidak memungkinkan untuk diberikan dosis dengan satu kali pemberian, sediaan uji dapat diberikan beberapa kali dalam jangka waktu pemberian sediaan uji tidak boleh melampaui 24 jam. Setelah diberikan perlakuan, pakan boleh diberikan kembali setelah 3-4 jam untuk tikus dan 1-2 jam untuk mencit. Bila sediaan uji diberikan beberapa kali, maka pakan boleh diberikan setelah perlakuan tergantung pada lama periode pemberian sediaan uji tersebut.

Volume cairan maksimal yang dapat diberikan tergantung pada ukuran hewan uji. Pada rodensia, jumlah normalnya tidak melampaui 1 mL/100 g berat badan, namun bila pelarutnya air dapat diberikan hingga 2 mL/100 g berat badan. Umumnya sediaan uji diberikan dalam volume yang tetap selama pengujian (konsentrasi berbeda), akan tetapi jika bahan uji berupa cairan atau campuran cairan, sebaiknya digunakan dalam bentuk tidak diencerkan (konsentrasi tetap). Pemberian sediaan uji dilakukan dengan dosis tunggal menggunakan *gavage* menggunakan tabung perut atau kanula intubasi yang sesuai.

3.c.2.4. Uji Batas

Uji batas digunakan terutama dalam situasi dimana adanya informasi bahwa sediaan uji cenderung bersifat nontoksik. Bila tidak terdapat atau

hanya terdapat sedikit informasi terkait toksisitas, atau sediaan uji diduga bersifat toksik maka harus dilakukan uji utama.

Penetapan uji batas ditetapkan berdasarkan kajian terhadap bahan dan produk. Pada uji untuk obat tradisional apabila berdasarkan kajian terhadap bahan dan produk memiliki justifikasi untuk dilakukan uji batas pada dosis 5000 mg/kg berat badan maka dapat dilakukan uji batas pada dosis tersebut dan pada dosis 2000 mg/kg berat badan.

Uji Batas pada 2000 mg/kg berat badan

Hewan uji diberikan senyawa uji sesuai dosis tersebut. Bila hewan mati, maka dilakukan uji utama untuk menentukan LD₅₀. Bila hewan uji bertahan hidup, diberikan 4 hewan uji tambahan secara berurutan sehingga total terdapat 5 hewan yang diuji. Bila, 3 hewan mati, uji batas dihentikan dan dilakukan uji utama. LD₅₀ lebih besar dari 2000 mg/kg berat badan bila 3 atau lebih hewan bertahan hidup. Bila hewan secara tidak terduga mati di akhir penelitian dan ada yang bertahan hidup, hentikan dosis dan dilakukan pengamatan pada semua hewan apakah hewan lain juga akan mati selama periode pengamatan yang sama (dilakukan pengamatan penuh selama 14 hari tanpa pemberian sediaan uji kembali). Kematian yang terlambat harus dihitung sama dengan kematian lainnya.

Evaluasi hasil sebagai berikut:

Keterangan : O = hidup, X = mati

a. LD₅₀ lebih kecil dari 2000 mg/kg berat badan ketika 3 atau lebih hewan mati:

O XO XX

O OX XX

O XX OX

O XX X

Bila hewan ketiga mati, dilakukan uji utama

b. LD₅₀ lebih besar dari 2000 mg/kg berat badan bila tiga atau lebih hewan bertahan hidup

O OO OO

O OO XO

O OO OX
O OO XX
O XO XO
O XO OO/X
O OX XO
O OX OO/X
O XX OO

Uji Batas pada 5000 mg/kg berat badan

Pengujian ini dilakukan hanya bila ada justifikasi ilmiah. Pengujian hewan dalam rentang GHS Kategori 5 (2000 – 5000 mg/kg berat badan) tidak disarankan dan hanya boleh dipertimbangkan jika ada kemungkinan kuat bahwa hasil uji memiliki relevansi yang kuat untuk melindungi manusia atau hewan.

Hewan uji diberikan senyawa uji sesuai dosis tersebut. Bila hewan mati, dilakukan uji utama untuk menentukan LD₅₀. Bila hewan dapat bertahan hidup maka diberikan dua hewan uji tambahan, bila kedua hewan bertahan hidup, LD₅₀ lebih besar dari 5000 mg/kg berat badan dan uji dihentikan (dilakukan pengamatan penuh selama 14 hari tanpa pemberian sediaan uji kembali).

Bila satu atau dua hewan mati, maka diberikan dua hewan tambahan, satu dalam setiap waktu. Bila hewan secara tidak terduga mati diakhir penelitian dan ada yang bertahan hidup, hentikan dosis dan dilakukan pengamatan pada semua hewan apakah hewan lain juga akan mati selama periode pengamatan yang sama. Kematian yang terlambat harus dihitung sama dengan kematian lainnya.

Evaluasi hasil sebagai berikut:

Keterangan : O = hidup, X = mati

c. LD₅₀ lebih kecil dari 5000 mg/kg berat badan ketika tiga atau lebih hewan mati:

O XO XX
O OX XX

O XX OX

O XX X

Bila hewan ketiga mati, dilakukan uji utama

- d. LD₅₀ lebih besar dari 5000 mg/kg berat badan bila tiga atau lebih hewan bertahan hidup

O OO

O XO XO

O XO O

O OX XO

O OX O

O XX OO

Untuk Obat Tradisional dapat menggunakan uji batas pada 5000 mg/kg berat badan

3.c.2.5. Uji Utama

Hewan tunggal diberikan senyawa uji secara berurutan dengan interval umumnya 48 jam dari hewan berikutnya, interval waktu pemberian ditentukan dari *onset*, durasi dan tingkat keparahan gejala toksisitas. Pemberian dosis berikutnya ke hewan harus ditunggu hingga telah diyakini keberlangsungan hidup hewan sebelumnya. Interval waktu dapat disesuaikan dengan keadaan saat penelitian misalnya pada *inconclusive response*. Pengujian akan lebih mudah diimplementasikan bila hanya digunakan waktu interval yang sama dalam setiap pengambilan keputusan untuk pemberian dosis berikutnya. Tidak diperlukan perhitungan ulang dosis atau *likelihood ratios* bila interval waktu berubah di tengah-tengah penelitian. Saat memilih dosis awal, semua informasi terkait bahan uji yang serupa dan hasil dari uji toksisitas lainnya harus dipertimbangkan dalam menentukan LD₅₀ dan kemiringan kurva dosis-respon.

Hewan pertama diberikan sediaan uji dengan dosis dibawah dosis estimasi LD₅₀. Bila hewan dapat bertahan hidup, hewan kedua diberikan dosis yang lebih tinggi. Bila hewan pertama mati atau terlihat hampir mati, hewan kedua diberikan dosis yang lebih rendah. Faktor progresi dosis harus dipakai dari antilog 1/estimasi kemiringan kurva dosis-respon dan harus

konstan selama penelitian (faktor kelipatan 3,2 berkorespondensi dengan kemiringan 2). Bila tidak ada informasi terkait nilai kemiringan untuk bahan uji, maka nilai faktor kelipatan 3,2 dapat digunakan. Menggunakan faktor kelipatan baku, dosis akan dipilih dari urutan ini : 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 2000 (atau 1,75; 5,5; 17,5; 55; 175; 550; 1750; 5000 untuk kebutuhan regulatori tertentu). Bila tidak ada nilai estimasi dari letalitas senyawa uji, maka dosis dapat dimulai dari 175 mg/kg berat badan (pada banyak kasus dosis ini merupakan dosis subletal). Bila toleransi hewan terhadap senyawa uji diekspektasikan memiliki variabel yang tinggi (misal: kemiringan diekspektasikan dibawah 2,0), harus dipertimbangkan untuk meningkatkan faktor progresi diatas standar 0,5 pada skala dosis log (yaitu faktor progresi 3,2) sebelum memulai pengujian. Demikian pula untuk senyawa uji dengan kemiringan yang sangat curam, faktor progresi dosis lebih kecil dari standar yang harus dipilih sesuai dengan progresi dosis pada uji *Up and Down Procedure* sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf I.

Pemberian dosis dilanjutkan tergantung dengan waktu interval. Pengujian dihentikan bila salah satu kriteria dibawah ini telah terpenuhi:

1. hewan secara berurutan/konsekutif dapat bertahan hidup pada dosis batas atas
2. 5 pembalikan dosis/*reversal* terjadi pada 6 hewan uji secara berurutan/konsekutif
3. Paling sedikit 4 hewan uji telah mengikuti pembalikan dosis/*reversal* dan *likelihood-ratios* yang ditentukan melebihi nilai kritis.

Untuk senyawa dengan variasi kombinasi LD₅₀ dan kemiringan, kriteria (3) akan terpenuhi dengan 4 sampai 6 hewan setelah pengujian *reversal*. Bila telah memenuhi kriteria penghentian maka nilai estimasi LD₅₀ harus dihitung.

Hewan yang sekarat dapat dikorbankan dan dipertimbangkan sebagai hewan yang mati saat pengujian. Bila hewan secara tidak terduga mati di akhir penelitian dan ada hewan lain yang bertahan hidup pada dosis tersebut atau dosis diatasnya, maka pengujian dihentikan dan dilakukan

observasi pada semua hewan untuk melihat apakah hewan lain juga akan mati pada lama waktu yang sama. Jika hewan yang sebelumnya bertahan hidup juga mati, dan diduga terjadi pada dosis melebihi LD₅₀ yang diprediksi maka sebaiknya pengujian diulang menggunakan dosis dua tingkat di bawah dosis terendah penyebab kematian. Tetapi bila hewan lainnya tetap bertahan hidup, tidak perlu dilakukan perubahan progresi dosis pada hewan.

3.c.2.6. Pengamatan

Hewan uji diobservasi secara individual sekurang-kurangnya pada 30 menit pertama setelah pemberian sediaan uji, dan secara periodik selama 4 jam pertama serta setelah 24 jam pemberian sediaan uji kemudian setiap hari setelah itu selama 14 hari. Namun durasi pengamatan dapat bervariasi dan diperpanjang tergantung dari reaksi toksik dan waktu *onset* serta lama waktu kesembuhan. Waktu timbul dan hilangnya gejala toksisitas (khususnya jika ada kecenderungan tanda-tanda toksik yang tertunda) harus dicatat secara sistematis dalam catatan individual yang dilakukan untuk setiap hewan.

Pengamatan tambahan perlu dilakukan jika hewan menunjukkan gejala toksisitas yang teramati berulang.

Hal-hal yang harus diamati dalam periode observasi adalah:

a. Kondisi dan tingkah laku hewan

Pengamatan yang dilakukan termasuk pada: kulit, bulu, mata, membran mukosa dan juga sistem pernafasan, sistem saraf otonom, sistem saraf pusat, aktivitas somatomotor serta tingkah laku. Selain itu, perlu juga pengamatan pada kondisi: gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, tidur dan koma. Hewan dalam kondisi sekarat dan hewan yang menunjukkan gejala nyeri yang berat atau tampak menderita harus dikorbankan. Hewan uji yang dikorbankan atau ditemukan mati, waktu kematiannya harus dicatat.

b. Berat Badan

Berat badan masing-masing hewan harus dimonitor pada saat sebelum

diberikan sediaan uji dan sekurang-kurangnya seminggu sekali. Perubahan berat badan harus dianalisis. Pada akhir penelitian, hewan yang masih bertahan hidup ditimbang dan kemudian dikorbankan.

c. Pemeriksaan Patologi

Seluruh hewan (termasuk yang mati selama penelitian maupun yang dimatikan) harus dinekropsi. Semua perubahan *gross* patologi dicatat untuk setiap hewan uji. Pemeriksaan mikroskopik (histopatologi) dari organ yang menunjukkan adanya perubahan secara *gross* patologi pada hewan yang bertahan hidup selama 24 jam atau lebih setelah pemberian dosis awal dapat dilakukan untuk mendapatkan informasi yang berguna.

3.c.2.7. Pengumpulan dan Analisis Data

Data masing-masing hewan harus tersedia dan semua data harus diringkas dalam bentuk tabel yang menunjukkan dosis uji yang digunakan; jumlah hewan yang menunjukkan gejala toksisitas; jumlah hewan yang ditemukan mati selama uji dan yang mati karena dikorbankan; waktu kematian masing-masing hewan; gambaran dampak toksik dan waktu dampak toksik; waktu terjadinya reaksi kesembuhan; dan penemuan nekropsi. Data harus dilengkapi dengan rasionalisasi dari pemilihan dosis awal dan progresi dosis.

Perhitungan LD₅₀ untuk Uji Utama

Nilai LD₅₀ dihitung menggunakan metode *likelihood maximum* kecuali untuk kasus tertentu. Rincian statistik berikut mungkin dapat digunakan dalam mengimplementasikan kemungkinan maksimum (dengan nilai σ diasumsikan). Semua kematian, baik langsung atau kematian yang tertunda atau kematian manusiawi, digabungkan untuk tujuan analisis kemungkinan maksimum. Mengikuti Dixon, fungsi kemungkinan dapat ditulis seperti berikut:

$$L = L_1 L_2 \dots L_n$$

Keterangan :

L merupakan *likelihood* dari hasil penelitian, dengan μ dan σ , dan n adalah total jumlah hewan yang diuji.

$L_i = 1 - F(Z_i)$ jika hewan ke - i hidup, atau

$L_i = F(Z_i)$, jika hewan ke-i mati,

Keterangan :

1. F = distribusi normal standar kumulatif
2. Z_i = $[\log(d_i) - \mu] / \sigma$
3. d_i = dosis yang diberikan ke hewan ke-i dan
4. σ = standar deviasi dalam satuan log dosis (bukan merupakan deviasi standar log)

Pada kondisi tertentu, perhitungan statistik tidak mungkin dilakukan atau akan memberikan hasil yang salah. Dilakukan cara khusus untuk menentukan/melaporkan perkiraan nilai LD_{50} . Jika kondisi tersebut tidak terjadi, nilai LD_{50} dihitung menggunakan metode *likelihood* maksimum.

Perhitungan *likelihood* maksimum dapat dilakukan menggunakan program komputer SAS (contoh: PROC NLIN) atau BMDP (misal program AR) sesuai dengan guideline pada OECD. Program komputer lain dapat digunakan.

Komputasi dari selang kepercayaan (*confidence interval*)

Setelah pengujian utama dan perkiraan perhitungan LD_{50} , dimungkinkan untuk menghitung perkiraan interval untuk LD_{50} . Setiap selang kepercayaan memberikan informasi yang terkait dengan reliabilitas dan kegunaan pengujian utama yang dilakukan. Selang kepercayaan yang lebar mengindikasikan bahwa lebih banyak ketidakpastian yang terkait dengan perkiraan LD_{50} . Reliabilitas dari nilai perkiraan LD_{50} rendah dan kegunaan dari nilai LD_{50} mungkin bersifat marginal. Selang kepercayaan yang sempit mengindikasikan bahwa ketidakpastian yang berkaitan dengan nilai LD_{50} relatif kecil. Reliabilitas dari nilai perkiraan LD_{50} lebih tinggi dan kegunaan dari nilai LD_{50} baik. Hal ini berarti, jika pengujian utama akan diulang, nilai perkiraan LD_{50} harus dekat dengan nilai perkiraan LD_{50} awal dan kedua estimasi harus dekat dengan nilai LD_{50} sebenarnya.

Dalam beberapa kasus, selang kepercayaan dilaporkan sebagai tidak terbatas, dengan menyertakan nilai nol sebagai ujung bawah atau tak

terhingga sebagai ujung atas atau keduanya. Interval seperti ini, sebagai contoh dapat muncul ketika semua hewan mati atau semua hewan hidup. Implementasi rangkaian prosedur ini membutuhkan program komputasi khusus, seperti menggunakan program dari USEPA atau OECD atau pengembangan dengan mengikuti detail teknis yang tersedia di USEPA atau guideline di OECD. Cakupan yang dicapai dari interval dan program khusus ini dijelaskan di laporan serta tersedia melalui USEPA.

3.c.3 PELAPORAN HASIL PENGUJIAN

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Senyawa uji
 - a. Tampilan fisik, kemurnian dan bila relevan, karakteristik fisikokimia (termasuk isomerisasi);
 - b. Data identifikasi termasuk nomor CAS.
2. Pembawa (disesuaikan)

Justifikasi pemilihan pembawa (selain air).
3. Hewan Uji
 - a. Spesies/galur;
 - b. Status mikrobiologi hewan, bila diketahui;
 - c. Jumlah, usia, jenis kelamin (termasuk bila perlu rasionalisasi penggunaan jantan daripada betina).
 - d. Sumber kondisi *housing* , diet dll.
4. Kondisi pengujian
 - a. Rasionalisasi dari pemilihan dosis awal, faktor progresi dosis dan untuk tingkat dosis lanjutan);
 - b. Detail dari formulasi senyawa uji, termasuk detail terkait bentuk fisik senyawa uji yang diberikan ke hewan;
 - c. Detail dari pemberian senyawa uji dan tempat pemberian termasuk volume dosis, luas area aplikasi dan lamanya paparan;
 - d. Detail dari kualitas makanan dan minuman (termasuk tupe/sumber diet, sumber air).
5. Hasil
 - a. Berat badan dan perubahannya;

- b. Tabulasi dari respon data dan tingkat dosis setiap hewan (yaitu : hewan menunjukkan gejala toksisitas termasuk kematian, keparahan dan durasi efek);
 - c. Berat badan individual hewan pada hari dipaparkan, dihitung pula dengan interval tiap minggu, serta pada waktu kematian atau saat dikorbankan;
 - d. Perjalanan waktu timbulnya toksisitas dan apakah efek tersebut reversibel pada tiap hewan;
 - e. Hasil nekropsi dan histopatologi tiap hewan, bila tersedia;
 - f. Data LD₅₀;
 - g. Hasil statistic (deskripsi rutinitas komputer yang digunakan dan perhitungan tabulasi *spreadsheet*).
6. Diskusi dan interpretasi hasil
 7. Kesimpulan

B. UJI TOKSISITAS SUBKRONIS ORAL

Uji toksisitas subkronis oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan secara oral pada hewan uji selama sebagian umur hewan, tetapi tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan.

Prinsip dari uji toksisitas subkronis oral adalah sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari (7 hari seminggu) pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok selama 14, 28 atau 90 hari, dan ditambahkan kelompok satelit untuk melihat adanya efek tertunda atau efek yang bersifat *reversibel*. Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama periode pemberian sediaan uji, bila belum melewati periode *rigor mortis* (kaku) segera dinekropsi, dan organ serta jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup dinekropsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ dan jaringan. Selain itu juga dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis dan histopatologi.

Tujuan uji toksisitas subkronis oral adalah untuk memperoleh informasi adanya efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut; informasi kemungkinan adanya efek toksik setelah paparan sediaan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu; informasi dosis yang tidak menimbulkan efek toksik (*No Observed Adverse Effect Level / NOAEL*); dan mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas zat tersebut.

1. PRINSIP

Sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji. Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama periode pemberian sediaan uji, bila belum melewati periode *rigor mortis* (kaku) segera dinekropsi, organ dan jaringan diamati secara makro patologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup dinekropsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ maupun jaringan, serta dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis dan histopatologi.

2. TUJUAN

Untuk memperoleh informasi adanya:

1. Efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut.
2. Efek toksik setelah paparan sediaan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu.
3. Dosis yang tidak menimbulkan efek toksik (*No Observed-Adverse Effect-Level/NOAEL*).
4. Mempelajari adanya efek kumulatif dan efek *reversibilitas* setelah paparan sediaan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu.

3. JENIS UJI TOKSISITAS SUBKRONIS:

3.a. Uji Toksisitas Subkronis Singkat Oral 14 hari pada Rodensia

Uji toksisitas subkronis singkat oral 14 hari digunakan untuk menguji sediaan uji yang penggunaannya secara klinis dalam bentuk sekali pakai atau berulang dalam waktu kurang dari 3 hari. Uji toksisitas subkronis singkat oral 14 hari digunakan untuk sediaan uji obat tradisional.

3.b. Uji Toksisitas Subkronis Singkat Oral 28 hari pada Rodensia

Uji toksisitas subkronis singkat oral 28 hari digunakan untuk menguji sediaan uji yang penggunaannya secara klinis dalam bentuk sekali pakai atau berulang dalam waktu kurang dari satu minggu.

3.c. Uji Toksisitas Subkronis Oral 90 hari pada Rodensia

Uji toksisitas subkronis oral 90 hari digunakan untuk menguji sediaan uji yang penggunaannya secara klinis berulang dalam waktu 1-4 minggu.

3.a. TOKSISITAS SUBKRONIS SINGKAT ORAL 14 HARI PADA RODENSIA

3.a.1. PROSEDUR

3.a.1.1. Hewan Uji dan Jumlah

Hewan uji yang disarankan adalah rodensia tikus putih (galur *Sprague Dawley* atau *Wistar*) atau dapat menggunakan hewan rodensia lain dengan disertai justifikasi. Kriteria hewan uji meliputi:

- a. Sehat;
- b. Umur 6-8 minggu;
- c. Untuk hewan betina harus belum pernah beranak dan tidak sedang bunting;

- d. Sebelum percobaan dimulai, hewan diaklimatisasi di ruang percobaan selama 5-7 hari;
- e. Hewan dikelompokkan secara acak sedemikian rupa sehingga penyebaran berat badan merata untuk semua kelompok dengan variasi berat badan tidak lebih 20% dari rata-rata berat badan.

Pengelompokan hewan uji antara lain:

- a. Kelompok kontrol, minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina;
- b. Kelompok perlakuan (sekurang-kurangnya 3 tingkatan dosis), masing-masing minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina;
- c. Kelompok satelit terdiri dari kelompok satelit kontrol dan kelompok satelit dosis tinggi dengan masing-masing minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina;
- d. Bila diperlukan ditambahkan kelompok *interim*, dimana hewan akan dieutanasia sebelum pengujian selesai, misalnya masing-masing 3 ekor hewan jantan dan 3 ekor hewan betina per kelompok untuk kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Untuk sediaan uji obat tradisional, kelompok *interim* tidak diperlukan.

3.a.1.2. Dosis Uji

Sekurang-kurangnya digunakan 3 kelompok dosis yang berbeda, 1 kelompok kontrol dan 2 kelompok satelit (kelompok dosis tinggi dan kelompok kontrol) serta bila diperlukan ditambahkan kelompok *interim* (pada kontrol dan semua dosis). Kelompok *interim* diperlukan misalnya untuk mengontrol apabila terjadi toksisitas pada waktu *interim*. Dosis sediaan uji yang paling tinggi harus menimbulkan efek toksik tetapi tidak menimbulkan kematian atau gejala toksisitas yang berat; dosis menengah menimbulkan gejala toksik yang lebih ringan sedangkan dosis yang paling rendah tidak menimbulkan gejala toksik (NOAEL).

3.a.1.3. Batas Uji

Bila pada dosis 1000 mg/kg berat badan tidak dihasilkan efek toksik, dosis tidak perlu dinaikkan lagi, meskipun dosis yang diharapkan untuk manusia belum tercapai.

3.a.1.4. Penyiapan Sediaan uji

Sediaan uji dilarutkan dengan bahan pembawa yang sesuai (misalnya aquadestilata, minyak nabati) sampai dengan dosis yang dikehendaki.

3.a.1.5. Cara Pemberian dan Volume Pemberian

Pada dasarnya cara pemberian sediaan uji harus disesuaikan dengan cara pemberian atau paparan yang diterapkan pada manusia, biasanya diberikan secara oral dengan volume pemberian 1 mL sediaan uji per 100 g berat badan hewan, tetapi dalam kondisi tertentu volume pemberian dapat sampai 2 mL sediaan uji per 100 g berat badan hewan apabila digunakan pembawa air.

3.a.1.6. Waktu Pemberian Sediaan uji

Sediaan uji diberikan setiap hari, 7 hari dalam 1 minggu selama 14 hari. Hal ini dilakukan dengan mempertimbangkan bahwa terdapat organ yang regenerasinya cepat dan dalam rangka mempertahankan konsentrasi sediaan uji dalam tubuh tetap/*steady state* sehingga efek toksik bisa diamati.

3.a.1.7. Pengamatan

Pengamatan terjadinya gejala-gejala toksik dan gejala klinis yang berupa perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa, sekresi, ekskresi, aktivitas otonom (misalnya lakrimasi, piloereksi, keadaan pupil (mengecil atau melebar), pola pernapasan yang tidak biasa), perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur), kejang dsb, dilakukan setiap hari selama 14 hari. Sedangkan untuk kelompok satelit pengamatan dilanjutkan selama 7 hari kemudian untuk mendeteksi proses penyembuhan kembali dari pengaruh toksik.

Menjelang akhir periode pengujian (pada minggu ke-2) sebaiknya dilakukan pemeriksaan reaktivitas sensorik terhadap rangsangan dari berbagai jenis (misalnya, rangsangan pendengaran, visual dan proprioseptif), pemeriksaan kekuatan cengkraman (*grip*) dan pemeriksaan aktivitas motorik.

3.a.1.8. Monitoring Berat Badan dan Konsumsi Makanan

Semua hewan ditimbang setidaknya setiap minggu. Volume sediaan uji ditentukan mengacu pada berat badan hewan yang terkini. Dalam pelaporan untuk pembuatan kurva berat badan biasanya data berat badan diplotkan 1 titik tiap minggu. Pengukuran konsumsi pakan harus dilakukan setidaknya setiap minggu. Jika bahan uji diberikan melalui air minum, konsumsi air juga harus diukur setidaknya setiap minggu.

3.a.1.9. Pengambilan Darah

Pada akhir percobaan, sebelum hewan dikorbankan, hewan dipuaskan semalaman. Prosedur pengambilan darah dilakukan sesuai dengan ketentuan umum. Sebanyak 0,5 mL darah dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus yang telah diisi antikoagulan (EDTA) sebanyak 10 µL untuk pemeriksaan hematologi, sebanyak 0,5 mL darah untuk pembuatan apusan darah pada penetapan deferensial leukosit. Sisanya dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian dipindahkan ke dalam tangas es tidak lebih dari 20 menit dan segera disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan dalam lemari beku (-20°C) untuk pemeriksaan biokimia klinis.

3.a.1.10. Pemeriksaan Hematologi

Pemeriksaan hematologi meliputi: konsentrasi hemoglobin, jumlah eritrosit (RBC/*Red Blood Cell*), jumlah leukosit (WBC/*White Blood Cell*), hematokrit, jumlah platelet (trombosit), perhitungan tetapan darah yaitu: MCV (*Mean Corpuscular Volume*), MCH (*Mean Corpuscular Hemoglobin*), MCHC (*Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*) dan penetapan diferensial leukosit. Pemeriksaan hematologi dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf J dan K atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

3.a.1.11. Pemeriksaan Biokimia Klinis

Pemeriksaan biokimia klinis menurut OECD meliputi: natrium, kalium, glukosa, kolesterol total, trigliserida, urea, kreatinin, total-protein, albumin dan setidaknya dua enzim yang menunjukkan efek hepatoseluler seperti GOT (*glutamat oksaloasetat transaminase*), GPT (*glutamat piruvat transaminase*), fosfatase alkali, *gamma glutamil transferase* (GGT), *glutamat dehidrogenase*), serta asam empedu (*bile acids*). Pengukuran enzim

tambahan (dari hati atau organ lainnya) dan bilirubin dapat dilakukan untuk memberikan informasi dalam keadaan tertentu. Hewan disarankan untuk dipuasakan semalam sebelum pengambilan darah terutama dalam pengukuran glukosa.

Sedangkan menurut WHO, pemeriksaan biokimia klinis meliputi: fungsi hati (GOT, GPT, Gamma GT (GGT)) dan fungsi ginjal (nitrogen urea, kreatinin, total-bilirubin). Parameter utama minimal yang harus diperiksa adalah glukosa, kolesterol total, trigliserida, GOT, GPT, nitrogen urea dan kreatinin. Pemeriksaan parameter tambahan biokimia klinis dapat dilakukan sesuai dengan mekanisme kerja sediaan uji. Pemeriksaan biokimia klinis dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf L - AA atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

Pengukuran urinalisis dapat dilakukan secara optional pada hari terakhir pengujian meliputi: penampilan (warna, kekeruhan), volume, osmolalitas atau berat jenis, pH, protein, glukosa dan sel darah. Pengukuran urinalisis perlu dilakukan jika bahan uji dipertimbangkan akan mempengaruhi sistem urinaria.

Selain itu, jika sifat bahan uji diketahui atau dicurigai dapat mempengaruhi profil metabolik maka dapat dilakukan pengukuran: kalsium, fosfat, trigliserida, hormon spesifik dan kolinesterase, dengan melihat kasus per kasus.

3.a.1.12. Pengamatan Makropatologi

Hewan yang telah dikorbakan harus segera dinekropsi dan dilakukan pengamatan secara makropatologi secara seksama untuk setiap organ.

3.a.1.13. Penimbangan Organ

Organ yang akan ditimbang harus dikeringkan terlebih dahulu dengan kertas penyerap, kemudian segera ditimbang untuk mendapatkan bobot organ absolut. Penimbangan dilakukan pada sekurang-kurangnya 5 organ utama yaitu hati, limpa, jantung, ginjal, paru dan ditambah organ sasaran yang diketahui secara spesifik. Bobot organ relatif dapat diperoleh dengan rumus berikut:

$$\text{Bobot organ relatif} = \frac{\text{bobot organ absolut}}{\text{bobot badan}}$$

3.a.1.14. Pemeriksaan Histopatologi

Pemeriksaan histopatologi dilakukan pada:

- a. Semua hewan pada kelompok kontrol dan kelompok dosis tertinggi.
- b. Hewan dari kelompok dosis lainnya yang menunjukkan adanya lesi kasar dan kelainan lainnya misalnya terjadi perubahan indeks organ dan kelainan hasil pemeriksaan laboratorium fungsi organ dan hematologi.
- c. Hewan dari kelompok satelit yang menunjukkan adanya lesi kasar dan kelainan lainnya misalnya terjadi perubahan indeks organ dan kelainan hasil pemeriksaan laboratorium fungsi organ dan hematologi.
- d. Hewan yang sekarat (*moribound*) dan mati selama periode pengujian.

Apabila terjadi kelainan histopatologi pada kelompok dosis tertentu maka semua hewan dalam kelompok tersebut juga harus dilakukan pemeriksaan histopatologi.

Pemeriksaan histopatologi meliputi: semua lesi makropatologi, otak (termasuk cerebrum, cerebellum dan pons), sumsum tulang belakang, mata, lambung, usus halus dan usus besar, hati, ginjal, adrenal, limpa, jantung, timus, tiroid, trakea, paru-paru, gonad (testis, indung telur), organ aksesoris kelamin (uterus, servik, epididimis, prostat, vesikula seminalis dengan *coagulating glands*), vagina, kantong kemih, limfo nodus, saraf tepi, otot skeletal dan tulang dengan sumsum tulang, atau sekurang-kurangnya 5 organ utama yaitu hati, limpa, jantung, ginjal, paru dan ditambah organ sasaran yang diketahui secara spesifik.

Jaringan berikut dapat memberikan indikasi yang bermakna untuk efek yang terkait dengan endokrin yaitu gonad (indung telur dan testis), organ

aksesoris kelamin (uterus termasuk serviks, epididimis, vesikula seminalis dengan *coagulating glands*, prostat dorsolateral dan ventral), vagina, pituitari, kelenjar susu hewan jantan, kelenjar tiroid dan adrenal. Organ-organ kecil seperti pituitari, tiroid, adrenal yang tidak memungkinkan untuk dibuat preparat histopatologi dapat diabaikan. Setiap organ dan jaringan yang sudah dipisahkan segera dimasukkan dalam larutan dapar formaldehida 10% atau larutan fiksasi yang sesuai dan dibuat preparat histopatologi kemudian diperiksa di bawah mikroskop. Pembuatan preparat histopatologi dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf BERAT BADAN atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

3.a.1.15. Evaluasi Hasil

Kajian yang dilakukan antara lain: evaluasi hubungan dosis dan efek yang terjadi untuk semua kelompok yaitu terjadinya efek toksik dan derajat toksisitas, yang meliputi perubahan berat badan, gejala klinis, parameter hematologi, biokimia klinis, makropatologi dan histopatologi, organ sasaran, kematian dan efek umum lain atau efek yang spesifik.

3.a.2. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Tinjauan Pustaka
3. Metode:
 - a. Jenis hewan, galur yang digunakan, dan justifikasi pemilihannya
 - b. Nama, bentuk, pemilihan dosis, justifikasi pemilihan bahan pembawa (jika selain air) dan cara pemberian sediaan uji
 - c. Kondisi pemeliharaan hewan: ukuran kandang, jumlah hewan perkandang, bahan pembuat kandang (aluminium, fiber atau bahan lain)
4. Hasil:
 - a. Efek toksik yang terjadi untuk setiap dosis dan jenis kelamin, termasuk tanda-tanda toksisitas; sifat, keparahan, dan durasi observasi klinis (baik reversibel atau tidak)
 - b. Waktu terjadinya gejala-gejala toksik dan kematian
 - c. Dosis paling rendah yang tidak menimbulkan gejala toksik (*No Observed-Adverse Effect-Level/NOAEL*)

- d. Data berat badan (dua kali dalam minggu) dan makanan yang dikonsumsi
 - e. Hasil pemeriksaan hematologi
 - f. Hasil pemeriksaan biokimia klinis
 - g. Penemuan hasil pemeriksaan makropatologi dan histopatologi
 - h. Bobot organ absolut dan relatif
 - i. Analisis statistik antara lain menggunakan ANOVA atau metode lain yang sesuai
5. Pembahasan
 6. Kesimpulan
 7. Daftar Pustaka

3.b. TOKSISITAS SUBKRONIS SINGKAT ORAL 28 HARI PADA RODENSIA

3.b.1. PROSEDUR

3.b.1.1. Hewan Uji dan Jumlah

Hewan uji yang disarankan adalah rodensia tikus putih (galur *Sprague Dawley* atau *Wistar*) atau dapat menggunakan hewan rodensia lain dengan disertai justifikasi. Kriteria hewan uji meliputi:

- a. Sehat;
- b. Umur 6-8 minggu;
- c. Untuk hewan betina harus belum pernah beranak dan tidak sedang bunting;
- d. Sebelum percobaan dimulai, hewan diaklimatisasi di ruang percobaan selama 5-7 hari;
- e. Hewan dikelompokkan secara acak sedemikian rupa sehingga penyebaran berat badan merata untuk semua kelompok dengan variasi berat badan tidak lebih 20% dari rata-rata berat badan.

Pengelompokan hewan uji antara lain:

- a. Kelompok kontrol, minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina;
- b. Kelompok perlakuan (sekurang-kurangnya 3 tingkatan dosis), masing-masing minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina;
- c. Kelompok satelit terdiri dari kelompok satelit kontrol dan kelompok satelit dosis tinggi dengan masing-masing minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina;

- d. Bila diperlukan ditambahkan kelompok *interim*, dimana hewan akan dieutanasia sebelum pengujian selesai, misalnya masing-masing 3 ekor hewan jantan dan 3 ekor hewan betina per kelompok untuk kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Untuk sediaan uji obat tradisional, kelompok *interim* tidak diperlukan.

3.b.1.2. Dosis Uji

Sekurang-kurangnya digunakan 3 kelompok dosis yang berbeda, 1 kelompok kontrol dan 2 kelompok satelit (kelompok dosis tinggi dan kelompok kontrol) dan bila diperlukan ditambahkan kelompok *interim* (pada kontrol dan semua dosis). Kelompok *interim* diperlukan misalnya untuk mengontrol apabila terjadi toksisitas pada waktu *interim*. Dosis sediaan uji yang paling tinggi harus menimbulkan efek toksik tetapi tidak menimbulkan kematian atau gejala toksisitas yang berat; dosis menengah menimbulkan gejala toksik yang lebih ringan sedangkan dosis yang paling rendah tidak menimbulkan gejala toksik (NOAEL).

3.b.1.3. Batas Uji

Bila pada dosis 1000 mg/kg berat badan tidak dihasilkan efek toksik, dosis tidak perlu dinaikkan lagi, meskipun dosis yang diharapkan untuk manusia belum tercapai.

3.b.1.4. Penyiapan Sediaan uji

Sediaan uji dilarutkan dengan bahan pembawa yang sesuai (misalnya aquadestilata, minyak nabati) sampai dengan dosis yang dikehendaki.

3.b.1.5. Cara Pemberian dan Volume Pemberian

Pada dasarnya cara pemberian sediaan uji harus disesuaikan dengan cara pemberian atau paparan yang diterapkan pada manusia, biasanya diberikan secara oral dengan volume pemberian 1 mL sediaan uji per 100 g berat badan hewan, tetapi dalam kondisi tertentu volume pemberian dapat sampai 2 mL sediaan uji per 100 g berat badan hewan apabila digunakan pembawa air.

3.b.1.6. Waktu Pemberian Sediaan uji

Sediaan uji diberikan setiap hari, 7 hari dalam 1 minggu selama 28 hari. Hal ini dilakukan dengan mempertimbangkan bahwa terdapat organ yang regenerasinya cepat dan dalam rangka mempertahankan konsentrasi sediaan uji dalam tubuh tetap/*steady state* sehingga efek toksik bisa diamati.

3.b.1.7. Pengamatan

Pengamatan terjadinya gejala-gejala toksik dan gejala klinis yang berupa perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa, sekresi, ekskresi, aktivitas otonom (misalnya lakrimasi, piloereksi, keadaan pupil (mengecil atau melebar), pola pernapasan yang tidak biasa), perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur), kejang dsb, dilakukan setiap hari selama 28 hari. Sedangkan untuk kelompok satelit pengamatan dilanjutkan selama 14 hari kemudian untuk mendeteksi proses penyembuhan kembali dari pengaruh toksik.

Menjelang akhir periode pengujian (pada minggu ke-4) sebaiknya dilakukan pemeriksaan reaktivitas sensorik terhadap rangsangan dari berbagai jenis (misalnya, rangsangan pendengaran, visual dan proprioseptif), pemeriksaan kekuatan cengkraman (*grip*) dan pemeriksaan aktivitas motorik.

3.b.1.8. Monitoring Berat Badan dan Konsumsi Makanan

Semua hewan ditimbang setidaknya setiap minggu. Volume sediaan uji ditentukan mengacu pada berat badan hewan yang terkini. Dalam pelaporan untuk pembuatan kurva berat badan biasanya data berat badan diplotkan 1 titik tiap minggu. Pengukuran konsumsi pakan harus dilakukan setidaknya setiap minggu. Jika bahan uji diberikan melalui air minum, konsumsi air juga harus diukur setidaknya setiap minggu.

3.b.1.9. Pengambilan Darah

Pada akhir percobaan, sebelum hewan dikorbankan, hewan dipuasakan semalaman. Prosedur pengambilan darah dilakukan sesuai dengan ketentuan umum. Sebanyak 0,5 mL darah dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus yang telah diisi antikoagulan (EDTA) sebanyak 10 µl untuk pemeriksaan hematologi, sebanyak 0,5 mL darah untuk pembuatan apusan darah pada penetapan deferensial leukosit. Sisanya dimasukkan

kedalam tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian dipindahkan ke dalam tangas es tidak lebih dari 20 menit dan segera disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan dalam lemari beku (-20°C) untuk pemeriksaan biokimia klinis.

3.b.1.10. Pemeriksaan Hematologi

Pemeriksaan hematologi meliputi: konsentrasi hemoglobin, jumlah eritrosit (RBC/*Red Blood Cell*), jumlah leukosit (WBC/*White Blood Cell*), hematokrit, jumlah platelet (trombosit), perhitungan tetapan darah yaitu: MCV (*Mean Corpuscular Volume*), MCH (*Mean Corpuscular Hemoglobin*), MCHC (*Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*) dan penetapan diferensial leukosit. Pemeriksaan hematologi dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf J dan K atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

3.b.1.11. Pemeriksaan Biokimia Klinis

Pemeriksaan biokimia klinis menurut OECD meliputi: natrium, kalium, glukosa, kolesterol total, trigliserida, urea, kreatinin, total-protein, albumin dan setidaknya dua enzim yang menunjukkan efek hepatoseluler seperti GOT (*glutamat oksaloasetat transaminase*), GPT (*glutamat piruvat transaminase*), fosfatase alkali, *gamma glutamil transferase* (GGT), *glutamat dehidrogenase*), serta asam empedu (*bile acids*). Pengukuran enzim tambahan (dari hati atau organ lainnya) dan bilirubin dapat dilakukan untuk memberikan informasi dalam keadaan tertentu. Hewan disarankan untuk dipuaskan semalam sebelum pengambilan darah terutama dalam pengukuran glukosa.

Sedangkan menurut WHO, pemeriksaan biokimia klinis meliputi: fungsi hati (GOT, GPT, Gamma GT (GGT)) dan fungsi ginjal (nitrogen urea, kreatinin, total-bilirubin). Parameter utama minimal yang harus diperiksa adalah glukosa, kolesterol total, trigliserida, GOT, GPT, nitrogen urea dan kreatinin. Pemeriksaan parameter tambahan biokimia klinis dapat dilakukan sesuai dengan mekanisme kerja sediaan uji. Pemeriksaan biokimia klinis dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf L - AA atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

Pengukuran urinalisis dapat dilakukan secara optional pada hari terakhir pengujian meliputi: penampilan (warna, kekeruhan), volume, osmolalitas atau berat jenis, pH, protein, glukosa dan sel darah. Pengukuran urinalisis perlu dilakukan jika bahan uji dipertimbangkan akan mempengaruhi sistem urinaria.

Selain itu, jika sifat bahan uji diketahui atau dicurigai dapat mempengaruhi profil metabolik maka dapat dilakukan pengukuran: kalsium, fosfat, trigliserida, hormon spesifik dan kolinesterase, dengan melihat kasus per kasus.

3.b.1.12. Pengamatan Makropatologi

Hewan yang telah dikorbankan harus segera dinekropsi dan dilakukan pengamatan secara makropatologi secara seksama untuk setiap organ.

3.b.1.13. Penimbangan Organ

Organ yang akan ditimbang harus dikeringkan terlebih dahulu dengan kertas penyerap, kemudian segera ditimbang untuk mendapatkan bobot organ absolut. Penimbangan dilakukan pada sekurang-kurangnya 5 organ utama yaitu hati, limpa, jantung, ginjal, paru dan ditambah organ sasaran yang diketahui secara spesifik. Bobot organ relatif dapat diperoleh dengan rumus berikut:

$$\text{Bobot organ relatif} = \frac{\text{bobot organ absolut}}{\text{bobot badan}}$$

3.b.1.14. Pemeriksaan Histopatologi

Pemeriksaan histopatologi dilakukan pada:

- a. Semua hewan pada kelompok kontrol dan kelompok dosis tertinggi.
- b. Hewan dari kelompok dosis lainnya yang menunjukkan adanya lesi kasar dan kelainan lainnya misalnya terjadi perubahan indeks organ dan kelainan hasil pemeriksaan laboratorium fungsi organ dan hematologi.
- c. Hewan dari kelompok satelit yang menunjukkan adanya lesi kasar dan kelainan lainnya misalnya terjadi perubahan indeks organ dan kelainan hasil pemeriksaan laboratorium fungsi organ dan hematologi.
- d. Hewan yang sekarat (*moribound*) dan mati selama periode pengujian.

Apabila terjadi kelainan histopatologi pada kelompok dosis tertentu maka

semua hewan dalam kelompok tersebut juga harus dilakukan pemeriksaan histopatologi.

Pemeriksaan histopatologi meliputi: semua lesi makropatologi, otak (termasuk cerebrum, cerebellum dan pons), sumsum tulang belakang, mata, lambung, usus halus dan usus besar, hati, ginjal, adrenal, limpa, jantung, timus, tiroid, trakea, paru-paru, gonad (testis, indung telur), organ aksesoris kelamin (uterus, servik, epididimis, prostat, vesikula seminalis dengan *coagulating glands*), vagina, kantong kemih, limfo nodus, saraf tepi, otot skeletal dan tulang dengan sumsum tulang, atau sekurang-kurangnya 5 organ utama yaitu hati, limpa, jantung, ginjal, paru dan ditambah organ sasaran yang diketahui secara spesifik.

Jaringan berikut dapat memberikan indikasi yang bermakna untuk efek yang terkait dengan endokrin yaitu gonad (indung telur dan testis), organ aksesoris kelamin (uterus termasuk serviks, epididimis, vesikula seminalis dengan *coagulating glands*, prostat dorsolateral dan ventral), vagina, pituitari, kelenjar susu hewan jantan, kelenjar tiroid dan adrenal. Organ-organ kecil seperti pituitari, tiroid, adrenal yang tidak memungkinkan untuk dibuat preparat histopatologi dapat diabaikan. Setiap organ dan jaringan yang sudah dipisahkan segera dimasukkan dalam larutan dapar formaldehida 10% atau larutan fiksasi yang sesuai dan dibuat preparat histopatologi kemudian diperiksa di bawah mikroskop. Pembuatan preparat histopatologi dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf BB atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

3.b.1.15. Evaluasi Hasil

Kajian yang dilakukan antara lain: evaluasi hubungan dosis dan efek yang terjadi untuk semua kelompok yaitu terjadinya efek toksik dan derajat toksisitas, yang meliputi perubahan berat badan, gejala klinis, parameter hematologi, biokimia klinis, makropatologi dan histopatologi, organ sasaran, kematian dan efek umum lain atau efek yang spesifik.

3.b.2. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Tinjauan Pustaka

3. Metode:

- a. Jenis hewan, galur yang digunakan, dan justifikasi pemilihannya
- b. Nama, bentuk, pemilihan dosis, justifikasi pemilihan bahan pembawa (jika selain air) dan cara pemberian sediaan uji
- c. Kondisi pemeliharaan hewan: ukuran kandang, jumlah hewan perkandang, bahan pembuat kandang (aluminium, fiber atau bahan lain)

4. Hasil:

- a. Efek toksik yang terjadi untuk setiap dosis dan jenis kelamin, termasuk tanda-tanda toksisitas; sifat, keparahan, dan durasi observasi klinis (baik reversibel atau tidak)
- b. Waktu terjadinya gejala-gejala toksik dan kematian
- c. Dosis paling rendah yang tidak menimbulkan gejala toksik (*No Observed-Adverse Effect-Level/NOAEL*)
- d. Data berat badan (dua kali dalam minggu) dan makanan yang konsumsi
- e. Hasil pemeriksaan hematologi
- f. Hasil pemeriksaan biokimia klinis
- g. Penemuan hasil pemeriksaan makropatologi dan histopatologi
- h. Bobot organ absolut dan relatif
- i. Analisis statistik antara lain menggunakan ANOVA atau metode lain yang sesuai

5. Pembahasan

6. Kesimpulan

7. Daftar Pustaka

3.c. TOKSISITAS SUBKRONIS ORAL 90 HARI PADA RODENSIA

3.c.1. PROSEDUR

3.c.1.1. Hewan Uji dan Jumlah

Hewan yang umumnya lebih dipilih untuk digunakan adalah rodensia tikus putih (galur *Sprague Dawley* atau *Wistar*) atau dapat menggunakan hewan rodensia lain dengan disertai justifikasi. Kriteria hewan uji meliputi:

- a. Sehat;
- b. Umur 6-8 minggu;
- c. Untuk hewan betina harus belum pernah beranak dan tidak sedang bunting;

- d. Sebelum percobaan dimulai, hewan diaklimatisasi di ruang percobaan selama 5-7 hari;
- e. Hewan dikelompokkan secara acak sedemikian rupa sehingga penyebaran berat badan merata untuk semua kelompok dengan variasi berat badan tidak melebihi 20% dari rata-rata berat badan

Pengelompokan hewan uji antara lain:

- a. Kelompok kontrol, minimal 20 ekor hewan yang terdiri dari 10 ekor hewan jantan dan 10 ekor hewan betina;
- b. Kelompok perlakuan (sekurang-kurangnya 3 tingkatan dosis), masing-masing minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina;
- c. Kelompok satelit terdiri dari kelompok satelit kontrol dan kelompok satelit dosis tinggi dengan masing-masing minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina;
- d. Bila diperlukan ditambahkan kelompok *interim*, dimana hewan akan dieutanasia sebelum pengujian selesai, misalnya masing-masing 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina per kelompok untuk kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Untuk sediaan uji obat tradisional, kelompok *interim* tidak diperlukan

3.c.1.2. Dosis Uji

Sekurang-kurangnya digunakan 3 kelompok dosis, 1 kelompok kontrol dan 2 kelompok satelit (kelompok dosis tinggi dan kelompok kontrol), dan bila diperlukan ditambahkan kelompok *interim* (pada kontrol dan semua dosis) untuk setiap jenis kelamin. Kelompok *interim* diperlukan misalnya untuk mengontrol apabila terjadi toksisitas pada waktu *interim*. Dosis sediaan uji yang paling tinggi harus menimbulkan efek toksik tetapi tidak menimbulkan kematian atau gejala toksisitas yang berat; dosis menengah menimbulkan gejala toksik yang lebih ringan; sedangkan dosis yang paling rendah tidak menimbulkan gejala toksik (NOAEL). Dosis efektif/dosis lazim harus masuk dalam salah satu kelompok dosis uji rendah atau menengah.

3.c.1.3. Batas Uji

Bila pada dosis 1000 mg/kg berat badan tidak dihasilkan efek toksik, dosis tidak perlu dinaikkan lagi, meskipun dosis yang diharapkan untuk manusia belum tercapai. Kecuali untuk bentuk sediaan cair, dosis diperhitungkan mempertimbangkan berat jenis produk jadi.

3.c.1.4. Penyiapan Sediaan uji

Sediaan uji dilarutkan dengan bahan pembawa yang sesuai (misalnya aquadestilata, minyak nabati) sampai dengan dosis yang dikehendaki.

3.c.1.5. Cara Pemberian dan Volume Pemberian

Pada dasarnya cara pemberian sediaan uji harus disesuaikan dengan cara pemberian atau paparan yang diterapkan pada manusia, biasanya diberikan secara oral dengan volume pemberian 1 mL sediaan uji per 100 g berat badan hewan, tetapi dalam kondisi tertentu volume pemberian dapat sampai 2 mL sediaan uji per 100 g berat badan hewan apabila digunakan pembawa air.

3.c.1.6. Waktu Pemberian Sediaan uji

Sediaan uji diberikan setiap hari, 7 hari dalam seminggu selama 90 hari. Hal ini dilakukan dengan mempertimbangkan bahwa terdapat organ yang regenerasinya cepat dan dalam rangka mempertahankan konsentrasi bahan uji dalam tubuh tetap/*steady state* sehingga efek toksik bisa diamati.

3.c.1.7. Pengamatan

Pengamatan terjadinya gejala-gejala toksik dan gejala klinis yang berupa perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa, sekresi, ekskresi, aktivitas otonom (seperti lakrimasi, pilo-ereksi, keadaan pupil (mengecil atau melebar) dan pola pernapasan yang tidak biasa), perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur), kejang, dll dilakukan setiap hari selama 90 hari. Sedangkan untuk kelompok satelit pengamatan dilanjutkan selama 28 hari kemudian, namun tanpa pemberian sediaan uji untuk mendeteksi proses penyembuhan kembali dari pengaruh toksik.

Jika diperlukan, dilakukan pemeriksaan oftalmologi dengan menggunakan oftalmoskop atau peralatan setara yang sesuai, sebaiknya dilakukan pada semua hewan sebelum pemberian bahan uji dan pada akhir pengujian.

Pemeriksaan setidaknya dilakukan pada kelompok dosis tinggi dan kelompok kontrol. Jika terdapat perubahan pada mata maka pemeriksaan dilakukan pada semua hewan. Menjelang akhir periode pengujian (dimulai pada minggu ke-11) sebaiknya dilakukan pemeriksaan reaktivitas sensorik terhadap rangsangan dari berbagai jenis (misalnya, rangsangan pendengaran, visual dan proprioseptif), pemeriksaan kekuatan cengkraman (*grip*) dan pemeriksaan aktivitas motorik.

3.c.1.8. Monitoring Berat badan dan Konsumsi Makanan

Semua hewan ditimbang setidaknya setiap minggu. Volume sediaan uji ditentukan mengacu pada berat badan hewan yang terkini. Dalam pelaporan untuk pembuatan kurva berat badan biasanya data berat badan diplotkan 1 titik tiap minggu. Pengukuran konsumsi pakan harus dilakukan setidaknya setiap minggu. Jika bahan uji diberikan melalui air minum, konsumsi air juga harus diukur setidaknya setiap minggu.

3.c.1.9. Pengambilan Darah

Pada akhir percobaan, sebelum hewan dikorbankan, hewan dipuasakan semalaman. Prosedur pengambilan darah dilakukan sesuai dengan ketentuan umum. Sebanyak 0,5 mL darah dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus yang telah diisi antikoagulan (EDTA) sebanyak 10 μ L untuk pemeriksaan hematologi, sebanyak 0,5 mL darah untuk pembuatan apusan darah pada penetapan diferensial leukosit. Sisanya dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) selama 10 menit, kemudian dipindahkan ke dalam tangas es tidak lebih dari 20 menit dan segera disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan dalam lemari beku (-200C) untuk pemeriksaan biokimia klinis.

3.c.1.10. Pemeriksaan Hematologi

Pemeriksaan hematologi meliputi: konsentrasi hemoglobin, jumlah eritrosit, jumlah leukosit, hematokrit, jumlah platelet (trombosit), perhitungan tetapan darah yaitu: MCV, MCH, MCHC dan penetapan diferensial leukosit. Pemeriksaan hematologi dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf J dan K atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

3.c.1.11. Pemeriksaan Biokimia Klinis

Pemeriksaan biokimia klinis meliputi: natrium, kalium, glukosa, kolesterol total, HDL, LDL, trigliserida, urea/BUN (*blood urea nitrogen*), kreatinin, total protein, albumin, dua atau lebih enzim yang menunjukkan efek hepatoseluler (seperti GOT, GPT, fosfatase alkali, *gamma glutamil transferase*, *sorbitol dehydrogenase*), dan asam empedu. Pengukuran enzim tambahan (dari hati atau organ lainnya) dan bilirubin dapat dilakukan untuk memberikan informasi dalam keadaan tertentu. Hewan disarankan untuk dipuaskan semalam sebelum pengambilan darah terutama dalam pengukuran glukosa.

Sedangkan menurut WHO pemeriksaan biokimia klinis meliputi: fungsi hati (GOT, GPT, Gamma GT (GGT)) dan fungsi ginjal (nitrogen urea, kreatinin, total bilirubin). Parameter utama minimal yang harus diperiksa adalah glukosa, kolesterol total, trigliserida, GOT, GPT, nitrogen urea dan kreatinin. Pemeriksaan parameter tambahan biokimia klinis dapat dilakukan sesuai dengan mekanisme kerja sediaan uji. Pemeriksaan biokimia klinis dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf L - AA atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

Pengukuran urinalisis dapat dilakukan secara optional pada hari terakhir pengujian meliputi: penampilan (warna, kekeruhan), volume, osmolalitas atau berat jenis, pH, protein, glukosa dan sel darah atau sel lainnya (misalnya sel epitel). Pengukuran urinalisis perlu dilakukan jika bahan uji dipertimbangkan akan mempengaruhi sistem urinaria.

Selain itu, jika sifat bahan uji diketahui atau dicurigai dapat mempengaruhi profil metabolik maka dapat dilakukan pengukuran: kalsium, fosfat, trigliserida puasa, hormon spesifik (seperti T3, T4, TSH dan hormon reproduksi yang dilakukan sesuai dengan kebutuhan), methemoglobin, dan kolinesterase dengan melihat kasus per kasus.

3.c.1.12. Pengamatan Makropatologi

Hewan yang telah dikorbankan harus segera dinekropsi dan dilakukan pengamatan secara makropatologi secara seksama untuk setiap organ. Untuk sediaan uji yang diduga mempengaruhi sistem reproduksi dapat dilakukan penentuan siklus estrus dengan metode apus vagina dengan tujuan memberikan status estrus hewan pada saat dieutanasia atau jaringan dikoleksi dan membantu evaluasi histopatologi.

3.c.1.13. Penimbangan Organ

Organ yang akan ditimbang harus dikeringkan terlebih dahulu dengan kertas penyerap, kemudian segera ditimbang untuk mendapatkan bobot organ absolut. Penimbangan dilakukan pada sekurang-kurangnya 5 organ utama yaitu hati, limpa, jantung, ginjal, paru dan ditambah organ sasaran yang diketahui secara spesifik. Bobot organ relatif dapat diperoleh dengan rumus berikut:

$$\text{Bobot organ relatif} = \frac{\text{bobot organ absolut}}{\text{bobot badan}}$$

3.c.1.14. Pemeriksaan Histopatologi

Pemeriksaan histopatologi dilakukan pada:

- a. Semua hewan pada kelompok kontrol dan kelompok dosis tertinggi.
- b. Hewan dari kelompok dosis lainnya yang menunjukkan adanya lesi kasar dan kelainan lainnya misalnya terjadi perubahan indeks organ dan kelainan hasil pemeriksaan laboratorium fungsi organ dan hematologi.
- c. Hewan dari kelompok satelit yang menunjukkan adanya esi kasar dan kelainan lainnya misalnya terjadi perubahan indeks organ dan kelainan hasil pemeriksaan laboratorium fungsi organ dan hematologi.
- d. Hewan yang sekarat (*moribound*) dan mati selama periode pengujian.

Apabila terjadi kelainan histopatologi pada kelompok dosis tertentu maka semua hewan dalam kelompok tersebut juga harus dilakukan pemeriksaan histopatologi.

Pemeriksaan histopatologi meliputi: semua lesi makropatologi, otak (termasuk cerebrum, cerebellum, dan medulla/pons), sumsum tulang belakang (pada tiga tingkatan: cervical, mid-toraks dan lumbar), pituitari, tiroid, paratiroid, timus, kerongkongan, kelenjar ludah, lambung, usus

halus dan usus besar, hati, pankreas, ginjal, adrenal, limpa, jantung, trakea, paru-paru, aorta, indung telur, uterus, servik, vagina, testis, epididimis, prostat, vesikula seminalis, *coagulation glands*, kelenjar susu (baik pada jantan dan betina), kantong kemih, kantung empedu (tikus), limfo nodus, saraf tepi, otot skeletal dan tulang dengan sumsum tulang, kulit dan mata (jika perubahan diamati selama pemeriksaan oftalmologi), atau sekurang-kurangnya 5 organ utama yaitu hati, limpa, jantung, ginjal, paru dan ditambah organ sasaran yang diketahui secara spesifik.

Organ-organ kecil seperti pituitari, tiroid, adrenal yang tidak memungkinkan untuk dibuat preparat histopatologi dapat diabaikan. Setiap organ dan jaringan yang sudah dipisahkan segera dimasukkan dalam larutan dapar formaldehida 10% atau larutan fiksasi yang sesuai dan dibuat preparat histopatologi kemudian diperiksa di bawah mikroskop. Pembuatan preparat histopatologi dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf BB atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

3.c.1.15. Evaluasi Hasil

Evaluasi hubungan dosis dan efek yang terjadi yaitu terjadinya efek toksik dan derajat toksisitas, yang meliputi perubahan berat badan, gejala klinis, parameter hematologi, biokimia klinis, makropatologi dan histopatologi, organ sasaran, kematian dan efek umum lain atau efek yang spesifik.

3.c.2. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Tinjauan Pustaka
3. Metode
 - a. Jenis hewan, galur yang digunakan, dan justifikasi pemilihannya;
 - b. Nama, bentuk, pemilihan dosis, justifikasi pemilihan bahan pembawa (jika selain air) dan cara pemberian sediaan uji;
 - c. Kondisi pemeliharaan hewan: ukuran kandang, jumlah hewan per kandang, bahan pembuat kandang (aluminium, fiber atau bahan lain).

4. Hasil:
 - a. Efek toksik yang terjadi untuk setiap dosis dan jenis kelamin termasuk tanda-tanda toksisitas; sifat, keparahan, dan durasi observasi klinis (baik reversibel atau tidak);
 - b. Waktu terjadinya gejala-gejala toksik dan kematian;
 - c. Dosis paling rendah yang tidak menimbulkan gejala toksik (*No Observed-Adverse Effect-Level/NOAEL*);
 - d. Data berat badan dan makanan yang dikonsumsi;
 - e. Alasan jika dilakukan pembunuhan hewan sebelum pengujian selesai dan penyebab kematian pada hewan yang ditemukan mati selama pengujian;
 - f. Hasil pemeriksaan hematologi;
 - g. Hasil pemeriksaan biokimia klinis;
 - h. Penemuan hasil pemeriksaan makropatologi dan histopatologi;
 - i. Bobot organ absolut dan relative;
 - j. Analisa statistik menggunakan ANOVA atau metode lain yang sesuai.
5. Pembahasan
6. Kesimpulan
7. Daftar Pustaka

C. UJI TOKSISITAS KRONIS ORAL

Uji toksisitas kronis oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji secara berulang selama sebagian besar umur hewan uji. Uji toksisitas kronis pada prinsipnya sama dengan uji toksisitas subkronis, tetapi sediaan uji diberikan pada hewan uji selama tidak kurang dari:

- a. 9 bulan untuk sediaan uji yang secara umum dikenal aman, misalnya pada pengembangan jamu menjadi obat herbal terstandar atau fitofarmaka; atau
- b. 12 bulan untuk senyawa murni atau sediaan uji yang memiliki potensi toksik misalnya sediaan uji yang mengandung bahan baru atau mengandung bahan kimia tertentu seperti kandungan alkaloidnya tinggi atau merupakan hasil fraksinasi yang profil keamanannya belum diketahui.

Tujuan dari uji toksisitas kronis oral adalah untuk mengetahui profil efek toksik setelah pemberian sediaan uji secara berulang selama waktu yang panjang, dan untuk menetapkan tingkat dosis yang tidak menimbulkan efek

toksik (NOAEL). Uji toksisitas kronis harus dirancang sedemikian rupa sehingga dapat diperoleh informasi toksisitas secara umum meliputi efek neurologi, fisiologi, hematologi, biokimia klinis dan histopatologi. Bilamana diperlukan pelaksanaan uji toksisitas kronis oral dapat dilakukan sekaligus dengan uji karsinogenisitas pada hewan yang sama dengan protokol merujuk pada OECD TG 453 (2018).

Uji toksisitas kronis digunakan untuk menguji obat, obat tradisional dan bahan lain yang penggunaannya berulang dalam jangka waktu lebih dari 4 minggu.

1. PRINSIP

Sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji selama 9 atau 12 bulan.

- a. Durasi uji toksisitas kronis oral 9 bulan dilakukan pada sediaan uji yang secara umum telah dikenal aman, misalnya pada pengembangan jamu menjadi obat herbal terstandar atau fitofarmaka
- b. Durasi uji toksisitas kronis oral 12 bulan untuk senyawa murni atau sediaan uji yang memiliki potensi toksik misalnya pada sediaan uji yang mengandung bahan baru atau mengandung bahan kimia tertentu seperti kandungan alkaloidnya tinggi atau merupakan hasil fraksinasi yang profil keamanannya belum diketahui

Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama periode pemberian sediaan uji, bila belum melewati periode rigor mortis (kaku) segera dinekropsi, organ dan jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup dinekropsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ maupun jaringan, serta dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis, histopatologi.

2. TUJUAN

Untuk memperoleh informasi adanya:

1. Efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas subkronis.
2. Karakterisasi toksisitas dari suatu sediaan uji yang dipaparkan dalam waktu lama dan berulang.

3. Untuk menentukan NOAEL yaitu dosis yang tidak menimbulkan efek toksik.

Bilamana diperlukan pelaksanaan uji toksisitas kronis oral dapat dilakukan sekaligus dengan uji karsinogenisitas pada hewan yang sama dengan protokol merujuk pada OECD TG 453 (2018).

3. PROSEDUR

3.a. Hewan Uji dan Jumlah

Hewan yang disarankan adalah rodensia tikus putih (galur *Sprague Dawley* atau *Wistar*). Kriteria hewan uji meliputi:

- a. Sehat;
- b. Umur 6-8 minggu (sesegera mungkin setelah *weaning* dan masa aklimatisasi);
- c. Untuk hewan betina harus belum pernah beranak dan tidak bunting;
- d. Sebelum percobaan dimulai, hewan diaklimatisasi di ruang percobaan selama 5-7 hari;
- e. Hewan dikelompokkan secara acak sedemikian rupa sehingga penyebaran berat badan merata untuk semua kelompok dengan variasi berat badan tidak melebihi 20% dari rata-rata berat badan.

Pengelompokan hewan uji antara lain:

- a. Kelompok kontrol, minimal 40 ekor hewan yang terdiri dari 20 ekor hewan jantan dan 20 ekor hewan betina;
- b. Kelompok perlakuan (minimal 3 tingkatan dosis), masing-masing minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina;
- c. Kelompok satelit terdiri dari kelompok satelit kontrol dan kelompok satelit dosis tinggi dengan masing-masing minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina;
- d. Bila diperlukan ditambahkan kelompok *interim*, dimana hewan akan dieutanasia sebelum pengujian selesai, masing-masing minimal 10 ekor hewan jantan dan 10 ekor hewan betina per kelompok untuk kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Untuk sediaan uji obat tradisional, kelompok *interim* tidak diperlukan;
- e. Bila diperlukan ditambahkan kelompok *sentinel* dengan tujuan untuk memantau status penyakit dengan jumlah hewan umumnya 5 ekor hewan

jantan dan 5 ekor hewan betina per kelompok untuk kelompok kontrol dan semua kelompok dosis

Jika hewan uji yang digunakan adalah mencit maka jumlah hewan perlu ditambah agar kebutuhan darah pada saat pemeriksaan hematologi dan biokimia klinis terpenuhi.

3.b. Dosis Uji

Sekurang-kurangnya digunakan 3 kelompok dosis yang berbeda; 1 kelompok kontrol; 2 kelompok satelit (kontrol dan dosis tertinggi) dan kelompok *interim* (kontrol dan semua dosis); serta bila diperlukan ditambahkan kelompok *sentinel* (kontrol dan semua dosis) untuk setiap jenis kelamin. Kelompok *interim* diperlukan misalnya untuk mengontrol apabila terjadi toksisitas pada waktu *interim*. Sedangkan kelompok *sentinel* jika perlu dapat ditambahkan untuk memantau status penyakit. Tingkat dosis yang paling tinggi harus menunjukkan efek toksik tetapi tidak menimbulkan insiden fatal; tingkat dosis menengah menunjukkan tingkatan pengaruh toksik; sedangkan tingkat dosis yang paling rendah tidak menimbulkan gejala toksik NOAEL. Dosis efektif/dosis lazim harus masuk dalam salah satu kelompok dosis uji rendah atau menengah.

3.c. Batas Uji

Bila pada dosis 1000 mg/kg berat badan tidak dihasilkan efek toksik, dosis tidak perlu dinaikkan lagi. Kecuali untuk bentuk sediaan cair, dosis diperhitungkan mempertimbangkan berat jenis produk jadi.

3.d. Penyiapan Sediaan uji

Sediaan uji dilarutkan dengan bahan pembawa yang sesuai (misalnya aquadestilata, minyak nabati) sampai dengan dosis yang dikehendaki.

3.e. Cara Pemberian dan Volume Pemberian

Pada dasarnya cara pemberian sediaan uji harus disesuaikan dengan cara pemberian atau paparan yang diterapkan pada manusia, biasanya diberikan secara oral dengan volume pemberian 1 mL sediaan uji per 100 g berat badan hewan, tetapi dalam kondisi tertentu volume pemberian dapat sampai 2 mL sediaan uji per 100 g berat badan hewan apabila digunakan pembawa air.

3.f. Waktu Pemberian Sediaan uji

Sediaan uji diberikan setiap hari, 7 hari dalam seminggu selama tidak kurang 9 atau 12 bulan. Durasi uji toksisitas kronis oral 9 bulan dilakukan pada bahan uji yang secara umum telah dikenal aman, sedangkan untuk senyawa murni atau bahan uji yang memiliki potensi toksik maka uji toksisitas kronis oral dilakukan selama 12 bulan. Pemberian setiap hari, 7 hari dalam seminggu dilakukan dengan mempertimbangkan bahwa terdapat organ yang regenerasinya cepat dan mempertahankan agar konsentrasi bahan uji dalam tubuh tetap/*steady state* sehingga efek toksik bisa diamati.

3.g. Pengamatan

Pengamatan terjadinya gejala-gejala toksik dan gejala klinis yang berupa perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa, sekresi, ekskresi, aktivitas otonom (seperti lakrimasi, pilo-ereksi, keadaan pupil dan pola pernapasan yang tidak biasa), perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur), kejang dsb dilakukan setiap hari selama periode pengujian. Sedangkan untuk kelompok satelit pengamatan dilanjutkan selama 28 hari kemudian, namun tanpa pemberian sediaan uji untuk mendeteksi proses penyembuhan kembali dari pengaruh toksik.

Jika diperlukan, dilakukan pemeriksaan oftalmologi dengan menggunakan oftalmoskop atau peralatan setara yang sesuai sebaiknya dilakukan pada semua hewan sebelum pemberian bahan uji dan pada akhir pengujian. Pemeriksaan setidaknya dilakukan pada kelompok dosis tinggi dan kelompok kontrol. Jika terdapat perubahan pada mata maka pemeriksaan dilakukan pada semua hewan.

Jika pada hasil uji toksisitas oral subkronis 28 hari atau 90 hari sebelumnya menunjukkan potensi menyebabkan efek neurotoksik maka reaktivitas sensorik terhadap rangsangan dari berbagai jenis (misalnya, rangsangan pendengaran, visual dan proprioseptif), pemeriksaan kekuatan cengkraman (*grip*) dan pemeriksaan aktivitas motorik secara optional dapat dilakukan sebelum dimulainya pengujian dan pada bulan ke- 3 hingga akhir pengujian.

3.h. Monitoring Berat Badan dan Konsumsi Makanan

Semua hewan ditimbang setidaknya setiap minggu. Volume sediaan uji ditentukan mengacu pada berat badan hewan yang terkini. Dalam pelaporan untuk pembuatan kurva berat badan biasanya data berat badan diplotkan 1

titik tiap minggu selama 13 minggu (3 bulan) pertama dan setelahnya setidaknya data berat badan diplotkan 1 titik setiap bulannya. Pengukuran konsumsi pakan harus dilakukan setidaknya setiap minggu selama 13 minggu (3 bulan) pertama dan setidaknya setiap bulan setelahnya. Jika bahan uji diberikan melalui air minum, konsumsi air juga harus diukur setidaknya setiap minggu selama 13 minggu (3 bulan) pertama dan setidaknya setiap bulan setelahnya.

3.i. Pengambilan Darah

Pada akhir percobaan, sebelum hewan dikorbankan, hewan dipuaskan semalaman. Prosedur pengambilan darah dilakukan sesuai dengan ketentuan umum. Sebanyak 0,5 mL darah dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus yang telah diisi antikoagulan (EDTA) sebanyak 10 µl untuk pemeriksaan hematologi, sebanyak 0,5 mL darah untuk pembuatan apusan darah pada penetapan diferensial leukosit. Sisanya dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) selama 10 menit, kemudian dipindahkan ke dalam tangas es tidak lebih dari 20 menit dan segera disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan dalam lemari beku (-20°C) untuk pemeriksaan biokimia klinis.

3.j. Pemeriksaan Hematologi

Pemeriksaan hematologi dilakukan minimal pada 10 tikus jantan dan 10 tikus betina per kelompok pada bulan ke 6 dan 9 atau 12. Pemeriksaan hematologi meliputi: konsentrasi hemoglobin, jumlah eritrosit, jumlah leukosit, hematokrit, jumlah platelet (trombosit), waktu protrombin, perhitungan tetapan darah yaitu: MCV, MCH, MCHC dan penetapan diferensial leukosit. Pemeriksaan hematologi dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf J dan K atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

3.k. Pemeriksaan Biokimia Klinis

Pemeriksaan biokimia klinis dilakukan minimal pada 10 tikus jantan dan 10 tikus betina per kelompok pada bulan ke 6 dan 9 atau 12. Hewan uji disarankan dipuaskan semalaman sebelum pengambilan sampel darah. Pemeriksaan biokimia klinis menurut OECD meliputi: natrium, kalium, kalsium, glukosa, total kolesterol, trigliserida, nitrogen urea, kreatinin, total protein, albumin, paling sedikit dua pemeriksaan untuk evaluasi hepatoseluler

(seperti GOT, GPT, *glutamate dehydrogenase*, asam empedu total), minimal dua pemeriksaan untuk evaluasi hepatobilier (seperti fosfatase alkali, *gamma glutamil transferase*, *5'-nukleotidase*, total bilirubin, asam empedu). Pengukuran biokimia klinik lainnya seperti trigliserida puasa, hormon spesifik, dan kolinesterase dapat dilakukan tergantung pada toksisitas sediaan uji.

Sedangkan menurut WHO pemeriksaan biokimia klinis meliputi: fungsi hati (GOT, GPT, gamma GT (GGT)) dan fungsi ginjal (nitrogen urea, kreatinin, total-bilirubin). Parameter utama minimal yang harus diperiksa adalah glukosa, total kolesterol dan trigliserida, GOT, GPT, nitrogen urea dan kreatinin. Pemeriksaan parameter tambahan biokimia klinis dapat dilakukan sesuai dengan mekanisme kerja sediaan uji. Pemeriksaan biokimia klinis dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf L - AA atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

Urinalisis sebaiknya dilakukan setidaknya pada 10 tikus jantan dan 10 tikus betina per kelompok dengan interval pemeriksaan yang sama dengan pemeriksaan hematologi dan biokimia klinis. Parameter yang diukur meliputi penampakan (warna dan kekeruhan), volume, osmolalitas atau berat jenis, pH, total protein, dan glukosa. Pemeriksaan lain dapat meliputi keton, urobilinogen, bilirubin dan *occult blood*.

3.1. Pengamatan Makropatologi

Hewan yang telah dikorbankan harus segera dinekropsi dan dilakukan pengamatan secara makropatologi secara seksama untuk setiap organ.

3.m. Penimbangan Organ

Organ yang akan ditimbang (bobot absolut) harus dikeringkan terlebih dahulu dengan kertas penyerap, kemudian segera ditimbang, sedangkan yang dianalisis adalah bobot relatif, yaitu bobot organ absolut dibagi bobot badan. Penimbangan dilakukan pada sekurang-kurangnya 5 organ utama yaitu hati, limpa, jantung, ginjal, paru dan ditambah organ sasaran yang diketahui secara spesifik. Bobot organ relatif dapat diperoleh dengan rumus berikut:

$$\text{Bobot organ relatif} = \frac{\text{bobot organ absolut}}{\text{bobot badan}}$$

3.n. Pemeriksaan Histopatologi

Pemeriksaan histopatologi dilakukan pada:

- a. Semua hewan pada kelompok kontrol dan kelompok dosis tertinggi.
- b. Hewan dari kelompok dosis lainnya yang menunjukkan adanya lesi kasar dan kelainan lainnya misalnya terjadi perubahan indeks organ dan kelainan hasil pemeriksaan laboratorium fungsi organ dan hematologi.
- c. Hewan dari kelompok satelit yang menunjukkan adanya lesi kasar dan kelainan lainnya misalnya terjadi perubahan indeks organ dan kelainan hasil pemeriksaan laboratorium fungsi organ dan hematologi.
- d. Hewan yang sekarat (*moribound*) dan mati selama periode pengujian.

Apabila terjadi kelainan histopatologi pada kelompok dosis tertentu maka semua hewan dalam kelompok tersebut juga harus dilakukan histopatologi

Pemeriksaan histopatologi dilakukan pada organ sesuai dengan Tabel 14.

Tabel 14. Organ yang dilakukan pemeriksaan histopatologi pada uji toksisitas oral kronis

semua lesi makropatologi	jantung	pankreas	lambung
adrenal	ileum	kelenjar paratiroid	[gigi]
aorta	jejunum	saraf tepi	testis,
otak (termasuk potongan cerebrum, cerebellum dan medulla/pons)	ginjal	kelenjar pituitari	timus
sekum	kelenjar lakrimal	prostat	tiroid
serviks	hati	rektum	[lidah]
<i>coagulating gland</i> (kelenjar aksesoris reproduksi jantan)	paru-paru	kelenjar ludah	trakea
kolon	limfo nodus	vesikula seminalis	kantong kemih
duodenum	kelenjar susu (wajib untuk hewan betina, pada jantan jika terlihat dapat dibedah)	otot skeletal	uterus
epididimis	[saluran pernapasan atas termasuk hidung, <i>turbinate</i> dan sinus paranasal]	kulit	[ureter]

mata (termasuk retina)	kerongkongan	sumsum tulang belakang (<i>cervical</i> , <i>mid-thoracic</i> dan <i>lumbar</i>)	[uretra]
[tulang paha dengan sendi]	[bohlam olfaktorius]	limpa	vagina
kantong empedu (untuk spesies selain tikus)	indung telur	[tulang dada]	bagian sumsum tulang dan/atau sumsum tulang segar yang disedot
kelenjar harderian			

*jaringan dalam tanda kurung siku [] merupakan opsional.

Pemeriksaan histopatologi sekurang-kurangnya dilakukan pada 5 organ utama yaitu hati, limpa, jantung, ginjal, paru dan ditambah organ sasaran yang diketahui secara spesifik. Organ-organ kecil seperti pituitari, tiroid, adrenal yang tidak memungkinkan untuk dibuat preparat histopatologi dapat diabaikan. Setiap organ dan jaringan yang sudah dipisahkan segera dimasukkan dalam larutan dapar formaldehida 10% atau larutan fiksasi yang sesuai dan dibuat preparat histopatologi kemudian diperiksa di bawah mikroskop. Pembuatan preparat histopatologi dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf BB atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

Dalam kasus organ berpasangan, misalnya ginjal, adrenal, kedua organ tersebut harus difiksasi. Temuan klinis dan temuan lainnya mungkin mengindikasikan perlunya memeriksa jaringan tambahan. Organ tertentu yang dianggap menjadi target berdasarkan sifat yang diketahui dari sediaan uji juga harus difiksasi.

3.o. Evaluasi Hasil

Evaluasi hubungan dosis dan efek yang terjadi yaitu terjadinya efek toksik dan derajat toksisitas, yang meliputi perubahan berat badan, gejala klinis, parameter hematologi, biokimia klinis, makropatologi dan histopatologi, organ sasaran, kematian dan efek umum lain atau efek yang spesifik.

4. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Tinjauan Pustaka
3. Metode:
 - a. Jenis hewan, galur yang digunakan, dan justifikasi pemilihannya;
 - b. Nama, bentuk, pemilihan dosis, justifikasi pemilihan bahan pembawa (jika selain air) dan cara pemberian sediaan uji;
 - c. Kondisi pemeliharaan hewan: ukuran kandang, jumlah hewan per kandang, bahan pembuat kandang (aluminium, fiber atau bahan lain).
4. Hasil:
 - a. Efek toksik yang terjadi untuk setiap dosis dan jenis kelamin termasuk tanda-tanda toksisitas; sifat, keparahan, dan durasi observasi klinis (baik reversibel atau tidak);
 - b. Waktu terjadinya gejala-gejala toksik dan kematian;
 - c. Dosis paling rendah yang tidak menimbulkan gejala toksik (*No Observed-Adverse Effect-Level/NOAEL*);
 - d. Data berat badan dan makanan yang dikonsumsi;
 - e. Alasan jika dilakukan pembunuhan hewan sebelum pengujian selesai dan penyebab kematian pada hewan yang ditemukan mati selama pengujian;
 - f. Hasil pemeriksaan hematologi;
 - g. Hasil pemeriksaan biokimia klinis;
 - h. Penemuan hasil pemeriksaan makropatologi dan histopatologi ;
 - i. Bobot organ absolut dan relative;
 - j. Analisa statistik menggunakan ANOVA atau metode lain yang sesuai.
5. Pembahasan
6. Kesimpulan
7. Daftar Pustaka

D. UJI TERATOGENISITAS

Uji teratogenisitas adalah suatu pengujian untuk memperoleh informasi adanya abnormalitas fetus yang terjadi karena pemberian sediaan uji selama masa pembentukan organ fetus (masa organogenesis). Informasi tersebut meliputi abnormalitas bagian luar fetus (morfologi), jaringan lunak serta kerangka fetus. Prinsip uji teratogenisitas adalah pemberian sediaan uji dalam

beberapa tingkat dosis pada beberapa kelompok hewan bunting selama paling sedikit masa organogenesis dari kebuntingan, satu dosis per kelompok. Satu hari sebelum waktu melahirkan induk dibedah, uterus diambil dan dilakukan evaluasi terhadap fetus.

1. PRINSIP

Umumnya bahan uji diberikan kepada hewan yang hamil minimal dari implantasi hingga satu hari sebelum hari untuk dikorbankan yang harus sedekat mungkin dengan hari normal persalinan tanpa risiko kehilangan data akibat persalinan dini. Pengujian ini tidak dimaksudkan untuk memeriksa periode organogenesis (misal 5-15 hari pada rodensia dan hari ke 6-18 pada kelinci) tetapi juga efek-efek dari praimplantasi, jika sesuai, selama seluruh periode kehamilan hingga hari operasi Caesar. Sesaat sebelum operasi Caesar, betina dikorbankan dan isi uterus diperiksa, jaringan lunak dan perubahan skeletal janin diperiksa. Fetus diperiksa gambaran makroskopis fetusnya (kematian, abnormalitas morfologi maupun ukuran) dan gambaran mikroskopisnya (organ dalam dan kerangka).

2. TUJUAN

Uji teratogenisitas bertujuan untuk memperoleh informasi adanya abnormalitas fetus yang terjadi karena pemberian zat selama masa perkembangan embrio; meliputi abnormalitas bagian tubuh luar, jaringan lunak serta kerangka fetus.

Pedoman ini didesain untuk memberikan informasi umum terkait dengan efek dari paparan prenatal pada hewan uji yang hamil dan pada perkembangan organisme, dapat termasuk penilaian efek maternal dan kematian, abnormalitas struktur atau perubahan pada pertumbuhan fetus. Defisit fungsional tidak termasuk pada uji ini

3. PROSEDUR

3.a. Hewan Uji

Pengujian teratogenisitas dapat menggunakan spesies hewan yang relevan dan spesies serta strain yang umumnya digunakan untuk pengujian toksisitas perkembangan prenatal. Namun yang biasa digunakan adalah tikus untuk golongan rodensia dan kelinci untuk golongan non rodensia. Harus dilakukan justifikasi bila menggunakan spesies lain. Kriteria hewan yang digunakan adalah betina nullipara, sehat, umur 12 minggu untuk tikus, 8 minggu untuk

mencit dan 5-6 bulan untuk kelinci. Hewan uji harus diaklimatisasi 5-7 hari di ruang pengujian. Hewan uji yang digunakan harus seragam spesies, galur, sumber, berat dan umurnya. Hewan betina dikawinkan dengan hewan jantan yang sama spesies dan galurnya dan dihindari perkawinan antara saudara kandung. Hari pembuktian terjadinya perkawinan ditetapkan sebagai awal kebuntingan (hari ke-0), ditandai dengan ditemukannya bercak sumbat vagina atau adanya sperma pada vagina yang dilihat secara mikroskopik. Pada saat karantina, setiap kandang tikus atau mencit diisi 5 ekor hewan, sedang pada saat dikawinkan kandang diisi 2 ekor jantan dewasa (umur 13 minggu) dan 3 ekor betina dewasa (umur 12 minggu) proestrus (masa prabirahi). Rasio jumlah hewan jantan dan betina dapat disesuaikan dengan kebutuhan berdasarkan uji pendahuluan untuk meningkatkan kebuntingan dengan mempertimbangkan ukuran kandang optimal. Setiap betina yang terbukti telah kawin diletakkan dalam kandang individual. Untuk mencegah keguguran akibat faktor-faktor yang tidak terkait sediaan uji maka harus dihindari penanganan berlebihan pada hewan yang tidak diperlukan dan pengaruh lingkungan seperti kebisingan.

Harus diperhatikan untuk menghindari diet atau alas tidur hewan yang mungkin mengandung zat aktif hormonal tinggi yang rentan atau mungkin mengganggu interpretasi hasil studi (misal fitoestrogen). Fitoestrogen yang tinggi dalam diet makanan laboratorium diketahui meningkatkan berat badan pada rodensia. Sebagai panduan, jumlah fitoestrogen pada diet hewan tidak boleh melebihi 350 µg setara ekivalensi genistein/gram makanan diet.

3.b. Jumlah Hewan Uji

Setiap kelompok uji dan kontrol harus memiliki jumlah hewan yang cukup untuk menghasilkan kira-kira 20 ekor tikus betina dengan implantasi di nekropsi. Kelompok yang kurang dari 16 hewan dengan implantasi mungkin tidak sesuai untuk studi. Kematian ibu hewan tidak serta merta membatalkan penelitian ini asalkan tidak melebihi sekitar 10 persen.

3.c. Preparasi Sediaan Uji

Pemilihan bahan pembawa sediaan uji harus mempertimbangkan pengaruh bahan pembawa terhadap efek absorpsi, distribusi, metabolisme dan retensi atau ekskresi dari sediaan uji.

3.d. Pemberian Sediaan Uji dan Dosis

Sediaan uji umumnya diberikan secara oral. Cara lain yang digunakan yaitu topikal, injeksi, melalui rektal dan lain-lain seperti pemakaian yang lazim digunakan pada manusia. Sediaan harus diberikan setiap kali pada saat yang lebih kurang sama waktunya.

Setidaknya digunakan tiga tingkat dosis dan kontrol bersamaan harus digunakan. Hewan sehat harus ditempatkan dengan cara yang tidak bias ke kelompok kontrol dan perlakuan. Sebelum pemberian sediaan uji harus dilakukan uji pendahuluan untuk menetapkan dosis uji atau berdasarkan penggunaan pada manusia atau hasil uji farmakodinamik. Tingkat dosis harus diberi jarak untuk menghasilkan gradasi efek toksik. Kecuali dibatasi oleh sifat fisik/kimiawi atau sifat biologis bahan kimia uji, dosis tertinggi harus dipilih dengan tujuan untuk menginduksi beberapa perkembangan dan/atau toksisitas ibu (tanda klinis atau penurunan berat badan) tetapi tidak untuk kematian atau penderitaan parah. Setidaknya satu tingkat dosis menengah harus menghasilkan efek toksik minimal yang dapat diamati. Tingkat dosis terendah seharusnya tidak menghasilkan bukti toksisitas baik pada ibu maupun perkembangan. Urutan tingkat dosis yang menurun harus dipilih dengan maksud untuk menunjukkan respon terkait dosis dan tingkat efek samping tanpa observasi (NOAEL) atau dosis yang mendekati batas deteksi yang memungkinkan penentuan dosis patokan. Interval dua hingga empat kali lipat seringkali optimal untuk menetapkan tingkat dosis yang menurun, dan penambahan kelompok uji keempat seringkali lebih disukai daripada menggunakan interval yang sangat besar (misalnya lebih dari faktor 10) di antara dosis. Meskipun pembentukan NOAEL maternal adalah tujuannya, studi yang tidak menetapkan level seperti itu mungkin juga dapat diterima.

Tingkat dosis harus dipilih dengan mempertimbangkan data toksisitas yang ada serta informasi tambahan tentang metabolisme dan toksikokinetik dari bahan kimia uji atau yang material terkait.

Kelompok kontrol harus digunakan bersamaan, dan harus mengikuti rejimen dosis yang sama dari kelompok yang diobati. Kelompok ini harus menjadi kelompok kontrol yang diperlakukan palsu atau kelompok pengendali bahan pembawa jika bahan pembawa digunakan dalam pemberian sediaan uji. Semua kelompok harus diberikan sediaan uji atau bahan pembawa dengan

volume yang sama. Hewan dalam kelompok kontrol harus ditangani dengan cara yang identik dengan hewan kelompok uji. Kelompok kontrol bahan pembawa harus menerima bahan pembawa dalam jumlah yang paling banyak digunakan (seperti pada kelompok perlakuan terendah)

Volume pemberian sediaan uji 1 mL/100 g berat badan, pada keadaan tertentu bila menggunakan bahan pembawa air volume pemberian dapat ditingkatkan menjadi 2 mL/100 g berat badan, bila menggunakan minyak jagung sebagai pembawa volume pemberian tidak boleh lebih dari 1 mL/100 g berat badan. Variasi volume pemberian sediaan uji harus dihindari, konsentrasi sediaan uji diatur sedemikian rupa agar volume pemberian konstan.

Sediaan uji diberikan setiap hari selama masa organogenesis yaitu hari ke 6 - 15 untuk tikus dan mencit, hari ke 6-14 untuk hamster, dan hari ke 6 -18 untuk kelinci.

3.e. Uji Batas

Bila sampai dosis 1000 mg/kg berat badan/hari dengan pemberian oral tidak memberikan efek toksisitas yang dapat diamati dan jika berdasarkan data tidak ada efek (misalnya, dari senyawa yang terkait secara struktural dan/atau metabolik), maka studi lengkap menggunakan tiga tingkat dosis mungkin tidak dianggap perlu. Untuk bentuk sediaan cair, dosis diperhitungkan mempertimbangkan berat jenis produk jadi.

Perkiraan paparan pada manusia mungkin menunjukkan kebutuhan tingkat dosis oral yang lebih tinggi untuk digunakan dalam uji batas. Untuk jenis pemberian lainnya, seperti inhalasi atau pemakaian pada kulit, sifat kimiawi fisik dari bahan kimia uji sering kali dapat menunjukkan tingkat paparan maksimum yang dapat dicapai (misalnya, penggunaan kulit tidak boleh menyebabkan toksisitas lokal yang parah).

3.f. Pelaksanaan Uji

- a. Sebelum pengujian dimulai hewan diaklimatisasi dalam ruang percobaan selama 5-7 hari. Sebelum hewan dikawinkan dapat dibuat apusan vagina untuk menentukan masa birahi pada tikus betina (tahap proestrus) dengan cara seperti yang tertera sesuai dengan penentuan tahap siklus proestrus pada tikus betina dewasa sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf CC

atau sesuai dengan metode yang valid dan sah. Hewan yang proestrus dikawinkan dengan menyatukan 3 ekor tikus betina dengan 2 ekor tikus jantan dalam satu kandang, dan keesokan harinya dilakukan pembuktian perkawinan dengan cara seperti yang tertera sesuai dengan pembuktian terjadinya perkawinan pada tikus sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf DD atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

- b. Hewan betina yang terbukti kawin dipelihara dalam kandang individual, pengamatan klinis terhadap induk dilakukan paling sedikit satu kali sehari pada saat yang lebih kurang sama.
- c. Sehari sebelum pemberian sediaan uji, induk (yang terbukti kawin) dikelompokkan secara acak dengan cara seperti yang tertera sesuai dengan alokasi hewan ke dalam kelompok perlakuan sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf EE atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.
- d. Umumnya pemberian sediaan uji diberikan setiap hari dari implantasi (misal hari ke-5 paska kawin) sampai ke hari sebelum operasi Caesar. Jika dari studi pendahuluan (bila tersedia) tidak menunjukkan potensi yang tinggi untuk kehilangan praimplantasi, pemberian sediaan uji dapat diperpanjang dengan mencakup seluruh periode kehamilan, dari kawin hingga sehari sebelum jadwal hewan dikorbankan. Umumnya penanganan hewan (handling) atau stres yang tidak tepat selama kehamilan dapat menyebabkan keguguran. Untuk mencegah kematian janin dari faktor-faktor yang tidak berhubungan dengan pengobatan, maka harus dihindari penanganan hewan bunting yang tidak perlu serta stres dari faktor luar seperti kebisingan. Selama masa pemberian sediaan uji, hewan uji diamati dua kali sehari dengan jarak 6 jam. Pengamatan kondisi hewan dilakukan setiap hari selama masa pengujian terhadap adanya kematian, keadaan sekarat, perubahan tingkah laku, dan gejala-gejala toksisitas. Berat badan ditimbang pada hari ke-0, selama pemberian sediaan uji, dan sebelum dinekropsi. Konsumsi makanan ditimbang 2 kali seminggu. Saat muncul dan lama gejala toksik harus diamati (seperti perubahan kulit, bulu, mata, dan lapisan mukosa). Hewan yang mati selama pengujian segera dibedah.
- e. Pada hari ke-20 untuk tikus, ke-18 untuk mencit, dan ke-29 untuk kelinci, pembedahan induk dilakukan dengan cara seperti yang tertera sesuai dengan pembedahan dan pengamatan teratologi umum tikus sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf FF atau sesuai dengan metode yang valid dan sah. Induk diperiksa secara makroskopik terhadap adanya perubahan struktur dan patologis, dihitung corpora lutea-nya. Uterus

dipindahkan dan isinya diperiksa. Pemeriksaan meliputi berat badan dan jenis kelamin fetus, adanya malformasi (jenis, jumlah, dan persentase) pada fetus hidup, kematian embrio (saat, keadaan, jumlah, dan persentase).

- f. Pemeriksaan fetus hidup dilakukan terhadap bagian luar seluruh fetus secara makroskopik. Untuk tikus, mencit dan marmut sejumlah 1/2 dari fetus hidup (secara acak) dibuat preparat kerangka dengan cara seperti tertera sesuai dengan pembuatan preparat kerangka fetus tikus sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf GG atau sesuai dengan metode yang valid dan sah dan diperiksa terhadap kelainan kerangka dengan cara seperti yang tertera sesuai dengan penilaian kerangka fetus tikus sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf HH atau sesuai dengan metode yang valid dan sah. Sejumlah 1/2 fetus hidup sisanya digunakan untuk pemeriksaan jaringan lunak dengan cara seperti yang tertera sesuai dengan penilaian jaringan lunak fetus tikus sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf II atau sesuai dengan metode yang valid dan sah. Untuk kelinci, setiap fetus hidup digunakan untuk pemeriksaan jaringan lunak dan kerangka.

Observasi

- a. Observasi hewan yang bunting: observasi klinis dilakukan dan direkam minimal sekali sehari, diusahakan pada waktu yang sama dengan mempertimbangkan periode puncak dari efek yang ingin diamati setelah pemberian sediaan uji. Kondisi hewan harus direkam termasuk kematian, hampir mati, perubahan perilaku dan semua tanda lain dari toksisitas.
- b. Berat badan dan konsumsi makanan
- Hewan harus ditimbang pada hari ke 0 atau selambat-lambatnya pada hari ke-3 jika hewan kawin diberikan oleh peternak luar, pada hari pertama pemberian dosis, setidaknya setiap 3 hari selama periode pemberian dosis dan pada hari dijadwalkan untuk dikorbankan. Ukuran berat badan dari induk hamil dan tidak hamil tidak boleh digabungkan.
 - Konsumsi makanan harus dicatat dalam interval tiga hari dan harus bertepatan dengan hari-hari penentuan berat badan.

c. Pemeriksaan *post-mortem*

- Induk harus dikorbankan secara manusiawi satu hari sebelum hari kelahiran yang diharapkan. Induk yang menunjukkan tanda-tanda aborsi atau persalinan prematur sebelum jadwal pengorbanan harus dibunuh dan menjalani pemeriksaan makroskopik menyeluruh.
- Pada saat penghentian atau kematian selama studi, bendungan harus diperiksa secara makroskopis untuk setiap kelainan struktur. Berat kelenjar tiroid dan penilaian histopatologi kelenjar tiroid harus diambil dari setiap induk yang bunting untuk mengamati perubahan patologis. Evaluasi induk yang bunting selama operasi caesar dan analisis janin selanjutnya sebaiknya dilakukan tanpa sepengetahuan kelompok perlakuan untuk meminimalkan bias. Upaya akan dilakukan untuk menghindari bias pengambilan sampel dengan mengacak pengumpulan sampel di seluruh kelompok perlakuan (yaitu menghindari pengumpulan semua dari satu kelompok dosis diikuti oleh kelompok dosis berikutnya, dan seterusnya).

d. Pemeriksaan kandungan urin

- Segera setelah penghentian atau setelah kematian, uteri harus diangkat dan status kebuntingan hewan dipastikan. Uteri yang tampak tidak hamil harus diperiksa lebih lanjut (misalnya dengan pewarnaan amonium sulfida untuk hewan pengerat dan pewarnaan Salewski atau metode alternatif yang cocok untuk kelinci) untuk memastikan status tidak hamil (13).
- Gravid uteri termasuk serviks harus ditimbang. Bobot rahim yang sehat tidak boleh diperoleh dari hewan yang ditemukan mati selama penelitian.
- Jumlah corpora lutea harus ditentukan untuk hewan bunting.
- Isi uterus harus diperiksa untuk mengetahui jumlah kematian embrio atau janin dan janin yang dapat hidup. Tingkat resorpsi harus dijelaskan (awal, akhir) untuk memperkirakan waktu relatif kematian konseptus.

e. Pemeriksaan fetus

- Jenis kelamin dan berat badan masing-masing janin harus ditentukan. Jarak anogenital (AGD) harus diukur pada semua janin hewan pengerat yang hidup.
- Setiap janin harus diperiksa perubahan eksternalnya.

- Janin harus diperiksa untuk mengetahui perubahan tulang dan jaringan lunak (misalnya variasi dan malformasi atau anomali) (15-32). Kategorisasi perubahan janin lebih dipilih tetapi tidak diharuskan. Saat kategorisasi dilakukan, kriteria untuk mendefinisikan setiap kategori harus dinyatakan dengan jelas. Perhatian khusus harus diberikan pada saluran reproduksi yang harus diperiksa untuk tanda-tanda perubahan tumbuh kembang. Jenis kelamin janin eksternal (seperti yang ditentukan oleh pemeriksaan kasar) harus dibandingkan dengan jenis kelamin internal (gonad) pada semua janin (diperiksa untuk malformasi tulang dan jaringan lunak). Selain itu, indikasi penurunan testis/kriptorkismus yang tidak lengkap harus diperhatikan pada janin laki-laki.
- Untuk hewan pengerat, kira-kira setengah dari setiap bayi harus disiapkan dan diperiksa untuk mengetahui adanya perubahan skeletal. Sisanya harus disiapkan dan diperiksa untuk pemeriksaan jaringan lunak, menggunakan metode pemotongan yang diterima atau sesuai atau teknik diseksi.
- Untuk non-hewan pengerat, mis. kelinci, semua janin harus diperiksa untuk jaringan lunak dan perubahan rangka. Tubuh janin ini dievaluasi dengan pembedahan hati-hati untuk melihat perubahan jaringan lunak, yang mungkin juga termasuk prosedur untuk mengevaluasi lebih lanjut struktur jantung internal (33). Setengah kepala janin yang diperiksa dengan cara ini harus dikeluarkan dan diproses untuk evaluasi perubahan jaringan lunak (termasuk mata, otak, saluran hidung, dan lidah), menggunakan metode pemotongan serial standar atau metode yang sama sensitifnya. Tubuh janin ini dan sisa janin utuh harus diproses dan diperiksa untuk mengetahui adanya perubahan rangka, menggunakan metode yang sama seperti yang dijelaskan untuk hewan pengerat.

f. Pengumpulan sampel darah (tikus)

- Semua sampel darah harus disimpan dalam kondisi yang sesuai. Sampel darah harus diambil sebagai berikut:
- Dari semua induk saat penghentian untuk penilaian wajib dari hormon tiroid T4, T3 dan hormon perangsang tiroid (TSH) dalam

jangka waktu yang singkat (misalnya dua jam) pada pagi hari nekropsi. Upaya harus dilakukan untuk menghindari bias pengambilan sampel dengan pengambilan darah acak di seluruh kelompok perlakuan. Sampel darah dari induk yang tidak hamil tidak boleh dikumpulkan dengan induk yang hamil.

- Sebagai pilihan, hormon lain dapat diukur jika relevan.
- Untuk kendali mutu, diusulkan agar data kendali historis dikumpulkan dan koefisien variasi dihitung untuk analitis, terutama untuk parameter yang terkait dengan fungsi sistem endokrin. Data ini dapat digunakan untuk tujuan perbandingan ketika studi selanjutnya dievaluasi.

3.g. Data

Data yang berupa angka dievaluasi dengan metode statistik yang tepat dengan menggunakan fetus sebagai unit analisis data. Metode statistik yang diterima secara umum atau metode statistik lanjutan baru harus digunakan; metode statistik harus dipilih sebagai bagian dari rancangan penelitian. Data dari hewan yang tidak bertahan hingga yang dikorbankan juga harus dilaporkan. Data ini dapat dimasukkan dalam sarana kelompok jika relevan. Relevansi data dari hewan semacam itu, dan oleh karena itu, penyertaan atau pengecualian dari setiap rata-rata kelompok, harus dinilai secara individual.

Data yang dilaporkan adalah keadaan hewan secara individual dan dirangkum dalam bentuk tabel yang memperlihatkan data setiap kelompok uji. Data menunjukkan jumlah hewan pada awal pengujian; persentase kebuntingan; jumlah induk yang memperlihatkan gejala toksisitas, deskripsi gejala toksisitas yang diamati, waktu dan lama terjadinya gejala toksisitas; jumlah dan persentase fetus hidup; kematian embrio; jenis, jumlah, variasi dan persentase malformasi bagian luar; kerangka dan jaringan lunak dari fetus hidup. Data yang berupa angka dievaluasi dengan metode statistik yang tepat dengan menggunakan fetus sebagai unit analisis data.

3.h. Evaluasi Hasil

Evaluasi terhadap hasil pengamatan meliputi efek teratogenik yang timbul dan tingkat dosis yang menghasilkan efek tersebut.

Evaluasi meliputi:

- hasil uji induk dan janin, termasuk evaluasi hubungan, atau ketiadaan, antara paparan hewan terhadap sediaan uji dan kejadian serta tingkat keparahan semua temuan;
- kriteria yang digunakan untuk mengkategorikan perubahan eksternal janin, jaringan lunak, dan skeletal jika kategorisasi telah dilakukan;
- data kendali historis untuk meningkatkan interpretasi hasil studi, yang sesuai;
- angka (mentah) yang digunakan untuk menghitung semua persentase atau indeks;
- analisis statistik yang memadai dari temuan penelitian, termasuk informasi yang cukup tentang metode analisis, sehingga peninjau/ ahli statistik independen dapat mengevaluasi kembali dan merekonstruksi analisis.

Pada setiap studi yang menunjukkan tidak adanya efek toksik, perlu dipertimbangkan untuk dilakukan investigasi lebih lanjut terkait absorpsi dan bioavailabilitas dari sediaan uji.

4. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian harus berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Tinjauan Pustaka
3. Metodologi yang meliputi:
 - a. Sediaan uji:
 - Keadaan fisik, sifat fisika kimia;
 - Identifikasi dan kemurnian bahan.
 - b. Bahan pembawa :
 - Alasan pemilihan pembawa (bila digunakan selain air).
 - c. Hewan uji :
 - Jenis dan galur;
 - Jumlah dan umur hewan uji;
 - Sumber dan kondisi kandang;
 - Berat individual hewan saat uji dimulai.
 - d. Kondisi pengujian
 - Pemilihan tingkatan dosis yang rasional;
 - Detil formulasi sediaan uji; konsentrasi, stabilitas dan homogenitas sediaan uji;

- Cara pemberian sediaan uji;
- Kondisi kandang dan ruangan pengujian;
- Kualitas makanan dan minuman/diet.

4. Hasil pengujian

a. Respon toksik dari induk;

- Jumlah hewan di awal pengujian, jumlah hewan yang bertahan hingga akhir pengujian, jumlah induk bunting, jumlah induk aborsi, jumlah induk yang melahirkan prematur;
- Gejala keracunan dan tingkat dosisnya;
- Waktu kematian induk bila tidak dapat bertahan hingga akhir percobaan;
- Waktu muncul dan penyebab gejala klinis abnormal;
- Data berat badan (kenaikan berat badan) (jika ada);
- Konsumsi pakan induk (jika ada).

b. Data fetus:

- Jumlah fetus per induk;
- Jumlah fetus hidup/mati, fetus resorpsi/tidak berkembang, jenis kelamin (jika ada), berat badan, cacat bagian luar, kelainan jaringan lunak dan kerangka.

5. Analisis statistik menggunakan metode uji statistik yang sesuai.

Interpretasi hasil:

Studi toksisitas perkembangan prenatal akan memberikan informasi tentang efek paparan oral berulang terhadap suatu zat selama kehamilan. Hasil penelitian harus diinterpretasikan dalam hubungannya dengan temuan penelitian sub-kronis, reproduksi, toksikokinetik dan lainnya. Karena ditekankan pentingnya pada titik akhir toksisitas umum dan toksisitas perkembangan, hasil penelitian ini akan memungkinkan adanya diskriminasi antara efek perkembangan yang terjadi tanpa adanya toksisitas umum dan yang hanya diekspresikan pada tingkat yang juga beracun bagi hewan induk. Dokumen Panduan OECD 43 harus dikonsultasikan untuk dalam interpretasi hasil reproduksi dan perkembangan. Dokumen Panduan OECD 106 tentang Evaluasi Histologis Tes Endokrin dan Reproduksi pada Hewan Pengerat memberikan informasi tentang persiapan dan evaluasi organ (endokrin) dan mungkin berguna untuk studi uji teratogenisitas.

E. UJI SENSITISASI KULIT

Uji sensitisasi kulit adalah suatu pengujian untuk mengidentifikasi suatu zat yang berpotensi menyebabkan sensitisasi kulit. Prinsip uji sensitisasi kulit adalah hewan uji diinduksi dengan dan tanpa *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) secara injeksi intradermal dan/atau topikal untuk membentuk respon imun, kemudian dilakukan ujiantang (*challenge test*).

1. PRINSIP

Hewan uji dapat diinduksi dengan metode adjuvan menggunakan *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) ataupun tanpa adjuvan. Induksi dilakukan dengan memberikan bahan uji melalui injeksi intradermal dan/atau topikal (epidermal) untuk membentuk respon imun, kemudian dilakukan ujiantang (*challenge test*). Tingkat dan derajat reaksi kulit dinilai berdasarkan skala *Magnusson* dan *Kligman*. Disarankan pada tahap pengamatan dilakukan tanpa mengetahui kelompok perlakuan atau kontrol (*blind reading*), untuk meminimalkan bias dalam evaluasi hasil.

Uji sensitisasi kulit dapat dilakukan dengan 2 metode yaitu:

- 1) Metode *Guinea Pig Maximisation Test/GPMT* yaitu uji sensitisasi kulit dengan menggunakan adjuvan *Freund's Complete Adjuvant* (FCA); atau
- 2) Metode *Buehler Test* yaitu uji sensitisasi kulit tanpa menggunakan adjuvan.

2. TUJUAN

Uji ini digunakan untuk mengidentifikasi sediaan uji yang berpotensi menyebabkan sensitisasi kulit.

3. PROSEDUR

3.a. Hewan Uji

Hewan yang digunakan untuk uji adalah marmut (*guinea pig*) albino dewasa muda dan sehat, berat 300 – 500 g, jantan dan/atau betina dan jika menggunakan hewan uji betina harus belum pernah beranak dan tidak bunting.

5.1. Metode *Guinea Pig Maximisation Test/GPMT*

Jumlah hewan uji tidak kurang dari 10 ekor tiap kelompok perlakuan dan 5 ekor kelompok kontrol. Apabila pada jumlah tersebut diatas belum/tidak dapat diambil kesimpulan, maka direkomendasikan untuk menambah hewan uji untuk mencapai total tidak kurang dari 20 ekor untuk kelompok

perlakuan dan 10 ekor untuk kelompok kontrol.

5.2. Metode *Buehler Test*

Jumlah hewan yang digunakan tidak kurang dari 20 hewan di kelompok perlakuan dan tidak kurang dari 10 hewan di kelompok kontrol.

3.b. Dosis Uji

Dosis sediaan uji yang digunakan untuk induksi hendaknya dapat ditoleransi secara sistemik dan dosis tertinggi yang dapat menyebabkan iritasi kulit ringan sampai sedang pada metode GPMT serta dosis tertinggi yang tidak lebih menyebabkan iritasi kulit ringan pada metode *Buehler Test*. Sedangkan untuk ujiantang, dosis tertinggi hendaknya tidak menyebabkan iritasi. Dosis yang tepat untuk uji ditentukan dengan uji pendahuluan pada 2 - 3 ekor hewan.

3.c. Penyiapan Sediaan Uji

Penyiapan sediaan uji dibuat secara aseptis.

a. Sampel padat:

- lembaran : sediaan uji dipotong dengan ukuran 2,5 x 2,5 cm dengan ketebalan tidak lebih dari 0,5 cm. Untuk kontrol dapat digunakan kasa steril non iritan.
- padat (solid) : sediaan uji dibuat serbuk, kemudian dibasahi hingga berbentuk pasta dengan air atau pelarut non iritan yang sesuai.

b. Sampel cair

Sediaan tidak perlu diencerkan, tetapi apabila diperlukan sampel dapat diencerkan dengan pelarut non iritan yang sesuai.

3.d. Penyiapan Hewan Uji

Sebelum pengujian dimulai, hewan uji diaklimatisasi di ruang percobaan setidaknya selama 5 hari dan hewan dikelompokkan secara acak. Hewan (marmut) dicukur bulunya 24 jam sebelum pengujian dimulai. Penghilangan bulu dapat juga menggunakan bahan kimia perontok bulu. Pada proses penghilangan bulu harus dijaga agar tidak terjadi luka atau lecet pada kulit.

3.e. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan bertujuan untuk menentukan dosis sediaan uji yang akan digunakan pada uji utama. Uji pendahuluan menggunakan 2- 3 ekor hewan.

1) Metode *Guinea Pig Maximisation Test* /GPMT

Berbagai konsentrasi sampel diaplikasikan pada daerah *flank*. Sediaan uji

(berat 0,5 g untuk bahan semi padat atau 0,5 mL untuk bahan cair) ditaruh di atas *chamber*, untuk bahan cair ditambahkan kertas saring (2 x 4 cm) lalu ditempelkan di atas kulit yang telah dicukur selanjutnya ditutup dengan balutan oklusif (*occlusive dressing*), kemudian diperban dengan perban elastis (*elastic bandage*). Setelah 24 jam, tempelan dibuka dan diamati. Untuk induksi topikal pada uji utama dipilih konsentrasi tertinggi yang menyebabkan eritema ringan atau sedang (skor 1-2), tetapi tidak menimbulkan pengaruh buruk pada hewan. Sedang untuk uji tantang (*challenge*) dipilih konsentrasi tertinggi yang tidak memberikan eritema (skor 0) dengan penilaian menurut Tabel 15.

Tabel 15. Skala *Magnusson* dan *Kligman*

Reaksi topikal	Skor
Tidak terlihat perubahan	0
Eritema ringan	1
Eritema sedang	2
Eritema berat dan edema	3

(ISO 10993-10, 2010)

2) Metode *Buehler Test*

Berbagai konsentrasi sampel diaplikasikan pada daerah *flank*. Sediaan uji (berat 0,5 g untuk bahan semi padat atau 0,5 mL untuk bahan cair) ditaruh di atas *chamber*, untuk bahan cair ditambahkan kertas saring (2 x 4 cm) lalu ditempelkan di atas kulit yang telah dicukur selanjutnya ditutup dengan balutan oklusif (*occlusive dressing*), kemudian diperban dengan perban elastis (*elastic bandage*). Setelah (6 ± 0,5) jam tempelan dibuka dan lakukan pengamatan pada (24 ± 2) jam dan (48 ± 2) jam setelah tempelan dilepas. Untuk induksi topikal pada uji utama dipilih konsentrasi tertinggi yang tidak/sedikit menyebabkan eritema (skor 0 - 1), tetapi tidak menimbulkan pengaruh buruk pada hewan. Sedangkan untuk uji tantang (*challenge*) dipilih konsentrasi tertinggi yang tidak memberikan eritema (skor 0) dengan penilaian menurut Tabel 15.

3.f. Uji Utama

1) Metode *Guinea Pig Maximisation Test* /GPMT

Fase Induksi Intradermal (Hari ke-0)

Induksi intradermal: bahan-bahan berikut ini disuntikan secara intradermal di bagian bahu/*scapular* masing-masing marmut.

- Daerah A/D : 0,1 mL campuran *FCA 50% (FCA/air atau NaCl 1:1 v/v)
- Daerah B/E : 0,1 mL **bahan uji dengan konsentrasi sesuai hasil uji pendahuluan.
- Daerah C/F : 0,1 mL campuran **bahan uji : FCA 50% (FCA/air atau NaCl 1:1 v/v)

* FCA dilarutkan dengan air atau NaCl fisiologis steril.

** Apabila bahan uji tidak larut air, maka FCA diencerkan dengan pelarut yang sesuai. Dosis bahan uji pada daerah C/F sama dengan dosis pada daerah B/E

Terhadap kelompok kontrol dilakukan hal yang sama hanya saja sampel sediaan uji diganti dengan pelarut.



Gambar 11. Lokasi penyuntikan intradermal

(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

Fase Induksi Topikal (Hari ke (7 ± 1))

Fase induksi topikal dilakukan (7 ± 1) hari setelah fase induksi intradermal. 24 jam sebelum perlakuan bagian bahu/*scapular* marmut dicukur lagi dan jika sediaan uji bukan merupakan iritan kulit, maka pada area uji diolesi dengan 0,5 mL 10% Natrium lauril sulfat dalam vaselin dengan tujuan untuk menimbulkan iritasi lokal.

Pada hari percobaan dioleskan 0,5 g untuk bahan uji semi padat dan 0,5 mL untuk bahan uji cair dengan dosis yang didapat dari hasil uji

pendahuluan ditaruh di atas *chamber*, untuk bahan cair ditambahkan kertas saring (2 x 4 cm) kemudian ditempelkan pada area uji masing-masing marmut sehingga menutupi tempat penyuntikan intradermal dan ditutup dengan balutan oklusif (*occlusive dressing*) selanjutnya dibalut dengan perban elastis (*elastic bandage*), setelah 48 jam tempelan dibuka dan diamati. Hal yang sama dilakukan terhadap kelompok kontrol, tetapi sediaan uji diganti dengan pelarut.

Uji Tantang / Challenge (Hari ke (21± 1))

Uji tantang dilakukan 14 hari setelah induksi topikal terhadap seluruh kelompok uji dan kelompok kontrol, dimana 24 jam sebelumnya dilakukan pencukuran pada bagian *flank*. Paparan sediaan uji tidak boleh dilakukan pada tempat induksi topikal, sediaan uji dipaparkan secara topikal pada daerah C di daerah *flank* marmut yang telah dicukur, kemudian ditutup dengan balutan oklusif (*occlusive dressing*) selanjutnya dibalut dengan perban elastis (*elastic bandage*). Hal yang sama dilakukan terhadap kelompok kontrol. Uji tantang perlu dilakukan pada kelompok kontrol untuk memastikan bahwa reaksi yang terjadi benar reaksi sensitisasi dan bukan reaksi iritasi. Setelah 24 jam, tempelan dibuka.

Sekitar 21 jam setelah tempelan dibuka, area uji dibersihkan dan dicukur jika diperlukan. Pengamatan dilakukan pada penampakan kulit di area uji tantang pada jam ke-24 dan 48 setelah tempelan dilepas, kemudian catat adanya edema dan eritema menurut penilaian skala *Magnusson* dan *Kligman*. Disarankan pada tahap pengamatan dilakukan tanpa mengetahui kelompok perlakuan atau kontrol (*blind reading*), untuk meminimalkan bias dalam evaluasi hasil. Pada kelompok kontrol bahan uji diganti dengan pelarut.

2) Metode *Buehler* Test

Fase Induksi Topikal

Pada hari ke-0, bahan uji diaplikasikan pada daerah *flank* yang telah dicukur. Sediaan uji (berat 0,5 g untuk bahan semi padat atau 0,5 mL untuk bahan cair) ditaruh di atas *chamber*, untuk bahan cair ditambahkan kertas saring (2 x 4 cm) lalu ditempelkan di atas kulit selanjutnya ditutup dengan balutan oklusif (*occlusive dressing*), kemudian diperban dengan perban elastis (*elastic bandage*). Setelah (6 ± 0,5) jam tempelan dibuka dan

dilakukan pengamatan. Prosedur yang sama dilakukan kembali pada area uji yang sama (bila diperlukan bulu dicukur kembali) pada hari ke- (7 ± 1) dan hari ke (14 ± 1). Hal yang sama dilakukan terhadap kelompok kontrol, tetapi sediaan uji diganti dengan pelarut.

Uji Tantang / Challenge

Uji tantang dilakukan 14 hari setelah induksi topikal terakhir terhadap seluruh kelompok uji dan kelompok kontrol, dimana 24 jam sebelumnya dilakukan pencukuran pada bagian *flank*. Paparan sediaan uji tidak boleh dilakukan pada tempat yang sama dengan induksi topikal. Sediaan uji dipilih konsentrasi tertinggi yang tidak memberikan eritema, dipaparkan secara topikal pada daerah *flank* marmut yang telah dicukur, kemudian ditutup dengan balutan oklusif (*occlusive dressing*) dan dibalut dengan perban elastis (*elastic bandage*). Setelah (6 ± 0,5) jam, tempelan dibuka.

Sekitar 21 jam setelah tempelan dibuka, area uji dibersihkan dan dicukur jika diperlukan. Pengamatan dilakukan pada penampakan kulit di area uji tantang pada jam ke-24 dan 48 setelah tempelan dilepas, kemudian catat adanya edema dan eritema menurut penilaian skala *Magnusson* dan *Kligman*. Disarankan pada tahap pengamatan dilakukan tanpa mengetahui kelompok perlakuan atau kontrol (*blind reading*), untuk meminimalkan bias dalam evaluasi hasil. Pada kelompok kontrol bahan uji diganti dengan pelarut.

3.g. Pengamatan

Reaksi kulit diuraikan dan kategorikan terhadap eritema dan uedema menurut skala *Magnusson* dan *Kligman* (Tabel 15). Catatan tambahan dapat dibuat jika ditemukan respon yang tidak biasa. Selain itu berat badan hewan uji sebelum dan setelah pengujian harus didata. Prosedur lain, misalnya pemeriksaan histopatologi, pengukuran ketebalan lipatan kulit, dapat dilakukan untuk mengklarifikasi reaksi yang meragukan.

3.h. Evaluasi Hasil

Menurut *Magnusson* and *Kligman* bila hasil uji sensitisasi mempunyai skor ≥ 1 maka dikategorikan sebagai sediaan yang bersifat *sensitizer*, asalkan skor < 1 terlihat pada kelompok kontrol. Jika skor ≥ 1 pada kelompok kontrol, maka reaksi pada hewan kelompok perlakuan yang melebihi reaksi paling parah pada kelompok kontrol dianggap sebagai akibat sensitisasi. Jika respon meragukan, maka untuk mengkonfirmasi hasil tersebut dianjurkan untuk

mengulang ujiantang (*rechallenge*) yang dilakukan 1 sampai 2 minggu setelah ujiantang yang pertama. Ujiantang kedua (*rechallenge*) disarankan menggunakan kelompok kontrol baru. Prosedur pengujian yang digunakan sama seperti ujiantang pertama, dengan menggunakan area yang belum pernah diuji.

3.i. Reliabilitas Hasil

Sensitivitas dan realibilitas dari teknik pengujian yang digunakan dikaji ulang setiap 6 bulan menggunakan bahan uji yang telah diketahui bersifat *sensitizer* ringan sampai sedang seperti *hexylcinnamic aldehyde*, *mercapto benzothiazole* dan *benzocaine*.

4. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan uji harus memuat informasi berikut:

1. Deskripsi dan cara paparan sediaan uji
 - a. Identifikasi data (misal: sumber, kemurnian, nomer batch);
 - b. Sifat fisika dan fisiokimia (misal: pH, volatilitas, kelarutan, stabilitas);
 - c. Apabila berupa campuran, komposisi dan persentase relatif dari komponen.
2. Zat pembawa/pelarut:
 - a. Identitas, konsentrasi (bila perlu), volume yang digunakan;
 - b. Alasan pemilihan zat pembawa/pelarut.
3. Hewan Uji:
 - a. Spesies/jenis dan galur hewan yang digunakan;
 - b. Jumlah hewan tiap jenis kelamin;
 - c. Umur tiap hewan pada permulaan pengujian;
 - d. Berat badan hewan pada awal dan akhir pengujian;
 - e. Sumber hewan, kondisi kandang, pakan, dan lain-lain.
4. Kondisi Pengujian:
 - a. Teknik penyiapan tempelan;
 - b. Rincian bahan tempelan yang digunakan dan teknik penempelan;
 - c. Hasil uji pendahuluan;
 - d. Rincian penyiapan, aplikasi dan pembersihan sediaan uji;
 - e. Konsentrasi sediaan uji yang digunakan untuk induksi dan ujiantang, jumlah total sediaan uji yang digunakan pada induksi dan ujiantang.
5. Hasil Uji:
 - a. Deskripsi dari metode yang digunakan untuk membuat skor;

- b. Data respon iritan dibuat dalam bentuk tabel;
 - c. Deskripsi dari derajat iritasi.
6. Penilaian hasil.
 7. Pembahasan dan Kesimpulan.
 8. Daftar Pustaka.

F. UJI IRITASI MATA

Uji iritasi mata adalah suatu uji pada hewan uji (kelinci albino) untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah paparan sediaan uji pada mata. Prinsip uji iritasi mata adalah sediaan uji dalam dosis tunggal dipaparkan kedalam salah satu mata pada beberapa hewan uji yang sebelumnya telah diberi analgesik sistemik dan anestetik lokal serta mata yang tidak diberi perlakuan digunakan sebagai kontrol. Derajat iritasi/korosi dievaluasi dengan pemberian skor terhadap cedera pada konjungtiva, kornea, dan iris pada interval waktu tertentu. Tujuan uji iritasi mata adalah untuk memperoleh informasi adanya kemungkinan bahaya yang timbul pada saat sediaan uji terpapar pada mata dan membran mukosa mata.

Hasil uji dievaluasi berdasarkan kriteria bahaya dari *Globally Harmonised System (GHS) for The Classification of Chemical* (2011), seperti pada Tabel 16.

Tabel 16. Kriteria penggolongan sediaan uji yang bersifat korosif/iritan pada mata

Kategori	Kriteria
Kategori 1 Efek irreversibel	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Setidaknya pada satu hewan terdapat efek di kornea, iris atau konjungtiva yang diperkirakan tidak akan berbalik atau belum sepenuhnya berbalik dalam periode pengamatan 21 hari ▪ Setidaknya 2 dari 3 hewan uji, memberikan respon positif: <ul style="list-style-type: none"> i. Derajat Opasitas kornea ≥ 3 dan/ atau ii. Iritis $> 1,5$; <p><i>Dihitung berdasarkan skor rata-rata penilaian pada 24, 48 dan 72 jam setelah pemberian senyawa uji</i></p>
Kategori 2 Efek reversibel <ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 A /Iritan 	<p>Setidaknya 2 dari 3 hewan yang diuji memberikan respon positif:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Derajat opasitas kornea ≥ 1 dan/atau ▪ Iritis ≥ 1 dan/atau ▪ Kemerahan konjungtiva ≥ 2 dan/atau ▪ Udema konjungtiva (kemosis) ≥ 2
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 B /Iritan ringan 	<p>Setidaknya 2 dari 3 hewan yang diuji memberikan respon positif dan efek yang dituliskan dibawah secara penuh bersifat reversibel dalam waktu 7 hari pengamatan:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Derajat opasitas kornea ≥ 1 dan/atau ▪ Iritis ≥ 1 dan/atau ▪ Kemerahan konjungtiva ≥ 2 dan/atau ▪ Udema konjungtiva (kemosis) ≥ 2 <p><i>Dihitung berdasarkan skor rata-rata penilaian pada 24, 48 dan 72 jam setelah pemberian senyawa uji</i></p>

1. PRINSIP

Hewan uji diberikan analgesik sistemik dan induksi topikal anestesi yang sesuai lalu sediaan uji dalam dosis tunggal dipaparkan kedalam salah satu mata pada beberapa hewan uji dan mata yang tidak diberi perlakuan digunakan sebagai kontrol. Derajat iritasi/korosi dievaluasi dengan pemberian skor terhadap cedera pada konjungtiva, kornea, dan iris pada interval waktu tertentu. Efek lain termasuk efek sistemik juga dievaluasi. Hewan uji yang menunjukkan tanda-tanda penderitaan dan kesakitan yang parah dapat dikorbankan sesuai dengan prosedur pemusnahan hewan uji. Durasi studi harus cukup dalam mengevaluasi efek reversibel dan ireversibel.

2. TUJUAN

Uji ini digunakan untuk memperoleh informasi adanya kemungkinan bahaya yang timbul pada saat sediaan uji terpapar pada mata dan membran mukosa mata.

Peringatan

Uji iritasi mata tidak perlu dilakukan dalam keadaan dimana:

- a. Bahan uji sudah dapat diprediksi bersifat korosif berdasarkan struktur kimia atau sifat fisiko kimia, misalnya asam ($\text{pH} \leq 2$) atau basa kuat ($\text{pH} \geq 11,5$).
- b. Bahan uji telah terbukti bersifat korosif atau iritan kuat pada uji iritasi kulit.
- c. Terdapat data dari studi lain yang relevan dan dapat dipercaya yang menunjukkan bahan uji akan menimbulkan iritasi serupa bila diuji pada mata.

3. PROSEDUR

3.a. Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah kelinci albino jantan atau betina yang sehat dan dewasa. Hewan ditempatkan pada kandang individual (satu kandang untuk satu hewan). Sebelum pengujian dimulai, hewan uji diaklimatisasi di ruang percobaan kurang lebih selama 5 hari. Kedua mata dari masing-masing hewan uji diperiksa minimal 24 jam sebelum pengujian dimulai dan dipastikan bahwa kedua mata hewan uji benar-benar sehat. Hewan yang menunjukkan adanya iritasi mata, cacat atau luka pada kornea tidak dapat digunakan untuk

pengujian.

3.b. Penggunaan Anestetik Topikal dan Analgesik Sistemik

Prosedur ini dilakukan untuk menghindari atau meminimalisir rasa sakit dan kesulitan pada pengujian keamanan okuler. Anestetik topikal dan analgesik sistemik lain yang sejenis yang tidak mempengaruhi respon okuler dengan tujuan yang sama dapat digunakan sebagai substitusi.

- 60 menit sebelum pemberian sediaan uji, buprenorphine 0,01 mg/kg berat badan diberikan secara injeksi subkutan untuk memberikan efek analgesik sistemik.
- Lima menit sebelum pemberian sediaan uji, satu atau dua tetes anestetik okular topikal (misal: 0,5% Propakain HCl atau 0,5 % Tetrakain HCl) diberikan pada setiap mata. Untuk menghindari kemungkinan interferensi pada studi, anestetik topikal yang diberikan direkomendasikan yang tidak mengandung pengawet. Bila sediaan uji diperkirakan menyebabkan rasa sakit signifikan, umumnya tidak dilakukan uji in vivo, tetapi bila diperlukan pengujian, dapat dipertimbangkan untuk memberikan anestetik topikal tambahan dengan interval 5 menit sebelum pemberian sediaan uji. Diperlukan kehati-hatian dalam menentukan jenis, konsentrasi, dan dosis dari zat anestesi lokal untuk menjamin bahwa perbedaan reaksi yang terjadi bukan karena anestesi lokal.
- Delapan jam setelah pemberian sediaan uji, diberikan buprenorphine 0,01 mg/kg berat badan subkutan dan meloksikam 0,5 mg/kg berat badan subkutan .
- Setelah 8 jam awal post-pemberian senyawa uji, buprenorphine 0,01 mg/kg berat badan secara subkutan diberikan setiap 12 jam, dan meloksikam 0,5 mg/kg berat badan secara subkutan setiap 24 jam hingga lesi okular selesai dan tidak ada gejala klinis nyeri.

Analgesia “Penolong” dapat diberikan segera setelah sediaan uji bila *preemptive* analgesik dan topikal anestesi tidak memadai. Bila hewan menunjukkan rasa sakit selama pengujian, dapat diberikan buprenorphine 0,03 mg/kg berat badan subkutan dan diulangi tiap 8 jam. Bila perlu, diberikan meloksikam 0,5 mg/kg berat badan subkutan setiap 24 jam (diberikan bersamaan dengan pemberian buprenorphine), tetapi tidak diberikan sebelum 8 jam setelah pemberian sediaan uji.

3.c. Dosis dan Preparasi Sediaan Uji

3.c.1. Sediaan uji cairan

Untuk sediaan uji yang berbentuk cairan, dosis yang digunakan adalah 0,1 mL. Sediaan uji yang disemprot tidak boleh digunakan untuk pemberian langsung pada mata. Cairan tersebut harus dikeluarkan dan ditampung dalam sebuah wadah sebelum diteteskan pada mata.

3.c.2. Sediaan uji padat

Untuk sediaan uji yang berbentuk padat, berpartikel dan pasta, jumlah yang digunakan harus memiliki berat yang tidak lebih dari 100 mg atau memiliki volume 0,1 mL. Sediaan uji dihaluskan sampai berbentuk bubuk halus dan volume/berat dari sediaan uji diukur kembali setelah dihaluskan.

3.c.3. Sediaan uji aerosol

1. Untuk sediaan uji aerosol, dianjurkan agar semua sediaan uji dikeluarkan dari wadahnya dan ditampung pada wadah lain, tidak boleh langsung disemprotkan pada mata.
2. Sediaan uji aerosol di dalam wadah bertekanan, dimana sediaan uji tidak dapat dikumpulkan/dikeluarkan disebabkan oleh vaporisasi, maka mata hewan uji harus ditahan dalam keadaan terbuka, dan pemberian sediaan uji ke mata dilakukan dengan cara penyemprotan singkat dalam waktu 1 detik, dari jarak 10 cm langsung di depan mata. Jarak semprot tersebut bervariasi dan tergantung pada tekanan dari semprotan dan isinya. Langkah ini harus dilakukan dengan hati-hati agar tidak merusak mata diakibatkan tekanan dari penyemprot. Pada kasus tertentu, dibutuhkan evaluasi mengenai kemungkinan kerusakan 'mekanik' pada mata akibat kekuatan dari semprotan.

Untuk memperkirakan dosis dari aerosol dapat dilakukan uji simulasi dengan cara sebagai berikut. Sediaan uji di semprotkan pada kertas timbang melalui celah yang dibuat sebesar mata kelinci. Peningkatan berat kertas digunakan untuk memperkirakan jumlah semprotan pada mata. Untuk zat yang mudah menguap, dosis dapat diestimasi dengan menimbang tabung sediaan uji sebelum dan sesudah pengeluaran sediaan uji.

3.c.4. Sediaan uji yang berupa wadah dan alat kesehatan yang digunakan untuk mata yang terbuat dari plastik dan polimer lain.

Sediaan uji dibuat secara aseptis di dalam lemari aseptis. Jumlah sediaan uji yang akan digunakan dapat dilihat pada Tabel 17. Jika luas daerah sampel tidak dapat ditentukan, maka digunakan 100 mg elastomer atau 200 mg plastik atau bahan lain untuk setiap 20 mL cairan ekstraksi. Media ekstraksi yang dapat digunakan adalah natrium klorida 0,9 % dan atau minyak zaitun. Ekstraksi dilakukan dengan cara pemanasan dalam oven pada suhu 50°C selama 72 ± 2 jam atau dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 60 menit. Kemudian ekstrak didekantasi dan disimpan pada suhu kamar, ekstrak digunakan maksimal 24 jam setelah ekstraksi. Terhadap kontrol dilakukan hal yang sama. Jumlah yang dipaparkan pada mata sama dengan jumlah sediaan uji berupa cairan yaitu 0,1 mL.

Tabel 17. Luas permukaan sampel yang digunakan

Bentuk bahan	Ketebalan	Jumlah sampel untuk setiap 20 mL media ekstraksi	Dibagi menjadi
Film atau lembaran	< 0,5 mm 0,5 – 1 mm	Setara dengan luas permukaan total 120 cm ² (kedua sisi) Setara dengan luas permukaan total 60 cm ² (kedua sisi)	Potongan $\pm 5 \times 0,3$ cm
Pipa/tabung	< 0,5 mm 0,5 – 1 mm	Panjang (dalam cm) = 120 cm ² / (jumlah keliling diameter dalam dan diameter luar) Panjang (dalam cm) = 60 cm ² / (jumlah keliling diameter dalam dan diameter luar)	Potongan $\pm 5 \times 0,3$ cm
Lempeng, pipa/ tabung dan bahan cetakan	> 1 mm	Setara dengan luas permukaan total 60 cm ² (semua permukaan yang terpapar)	Potongan sampai $\pm 5 \times 0,3$ cm
Elastomer	> 1 mm	Setara dengan luas permukaan total 25 cm ² (semua permukaan yang terpapar)	Tidak boleh dibagi-bagi

(Farmakope Indonesia edisi IV)

3.d. Cara Pemberian Sediaan Uji

Sediaan uji dipaparkan dalam kantung konjungtiva (*conjunctival sac*) dari salah satu mata setelah kelopak mata bawah ditarik dengan hati-hati. Kelopak mata tetap dipegang selama sekitar 1 detik untuk mencegah hilangnya sediaan uji. Untuk sediaan uji yang berbentuk padat, pasta, dan berpartikel, jika sediaan uji tidak dapat hilang dari mata hewan uji dengan mekanisme fisiologi pada observasi pertama (satu jam setelah diberi perlakuan), maka mata hewan uji harus dicuci dengan larutan NaCl fisiologis atau aqua destilata.

3.e. Pencucian

Mata hewan uji tidak boleh dicuci sebelum 24 jam setelah pemberian sediaan uji, kecuali untuk sediaan uji padat dan sediaan yang langsung berefek iritasi atau korosi. Apabila sediaan uji bersifat sangat iritan, digunakan 2 ekor hewan tambahan, 30 detik setelah paparan sediaan uji mata dicuci dengan 5 mL NaCl fisiologis dengan cara disemprotkan perlahan selama 30 detik.

Penggunaan kelompok tambahan untuk mengetahui pengaruh pencucian tidak direkomendasikan kecuali ada alasan ilmiah. Jika pengaruh pencucian ingin diketahui, maka dibutuhkan kelompok tambahan (2 ekor kelinci). Kondisi pencucian harus didokumentasi, seperti waktu pencucian, komposisi dan suhu dari larutan pencuci, lama pencucian, volume dan kecepatan pemberian larutan pencuci.

3.f. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan dengan menggunakan 1 ekor hewan uji. Jika hasilnya mengindikasikan bahwa sediaan uji bersifat korosif atau iritan kuat pada mata, maka pengujian lebih lanjut tidak boleh dilakukan.

3.g. Anestesi Lokal

Diperlukan kehati-hatian dalam menentukan jenis, konsentrasi, dan dosis dari zat anestesi lokal untuk menjamin bahwa perbedaan reaksi yang terjadi bukan karena anestesi lokal. Mata kontrol juga harus dianestesi dengan cara yang sama. Biasanya jenis anestesi yang digunakan adalah prokain HCl dan tetrakain HCl dengan cara meneteskan ke dalam mata kelinci sebanyak 5-10 tetes.

3.h. Uji Konfirmasi

Jika efek korosif dari sediaan uji tidak terdeteksi pada uji pendahuluan, maka harus dilakukan uji konfirmasi menggunakan paling sedikit 2 ekor hewan

tambahan. Jika terdapat petunjuk kemungkinan terjadinya iritasi berat pada uji konfirmasi, maka uji konfirmasi dilakukan pada 1 hewan uji lebih dahulu dan jangan keduanya sekaligus. Apabila uji pada 1 ekor hewan tidak memperlihatkan efek iritan/korosif maka pengujian dapat dilanjutkan pada hewan yang ke-2. Jika hewan pertama pada uji konfirmasi ini memperlihatkan adanya iritasi atau korosi, maka uji tidak boleh dilanjutkan.

3.i. Pengamatan

Pengamatan pada mata dilakukan secara komprehensif untuk melihat adanya lesi okuler satu jam setelah paparan sediaan uji dan diikuti dengan evaluasi harian. Hewan harus dievaluasi beberapa kali dalam tiga hari pertama. Pengamatan dilakukan minimal dua kali sehari sepanjang studi dengan minimum rentang antar observasi adalah 6 jam.

Observasi dan pengamatan derajat keparahan dilakukan pada jam ke-1, 24, 48 dan 72 setelah paparan sediaan uji. Jika hewan uji tidak memperlihatkan cedera mata, maka pengujian dapat diakhiri pada hari ke-3 setelah pemberian sediaan uji. Hewan uji dengan cedera mata ringan hingga sedang harus diamati sampai lukanya sembuh. Observasi dilakukan pada hari ke 7, 14 dan 21 untuk mengevaluasi adanya reversibilitas dari pengaruh iritasi setelah pemberian sediaan uji. Jika efek reversibel terjadi sebelum 21 hari, maka percobaan dapat dihentikan. Hewan uji yang menunjukkan gejala-gejala sakit dan mengalami luka parah setelah pemberian sediaan uji harus segera dikorbankan. Yang dimaksud luka parah antara lain: terjadinya pelubangan kornea atau penanahan pada kornea termasuk *staphyloma*; perdarahan pada mata; opasitas kornea tingkat 4 yang bertahan selama 48 jam; hilangnya reflek terhadap cahaya (respon iridial tingkat 2) yang bertahan selama 72 jam; penanahan pada membran konjungtiva; nekrosis membran konjungtiva; atau pengelupasan membran niktitan. Jenis cedera tersebut diatas biasanya bersifat *irreversibel*. Pemeriksaan reaksi mata dapat dilakukan dengan menggunakan *loupe* binokuler, *hand slit-lamp*, biomikroskop, atau alat lain yang sesuai. Setelah pencatatan pengamatan dalam 24 jam, mata dapat diperiksa lebih lanjut dengan bantuan dari *fluorescein*.

3.j. Penilaian

Penilaian reaksi sediaan uji terhadap mata dinilai dan dicatat sesuai dengan skor pada Tabel 18. Penilaian dari reaksi mata (konjungtiva, kornea, iris) dan luka lain pada mata (seperti *pannus*, warna) atau efek sistemik harus dilaporkan.

Skor iritasi mata yang harus dievaluasi adalah terhadap derajat cedera mata dan ada atau tidaknya reversibilitas. Skor individu tidak mewakili standar absolut untuk sifat iritan dari sediaan uji. tetapi harus dilihat sebagai nilai referensi. Skor iritasi sediaan uji adalah kombinasi dari seluruh observasi dari pengujian.

Ekstrapolasi hasil pengujian iritasi mata pada hewan ke manusia valid hanya dalam batas tertentu, karena dalam beberapa kasus kelinci albino lebih sensitif dibanding manusia dalam hal iritasi/korosi mata.

Tabel 18. Penilaian luka okular pada mata

Obyek pengamatan	Skor
Kornea : Derajat Opasitas/ kejernihan	
Jernih.....	0
Sedikit redup dibanding normal; bagian iris jelas terlihat	1
Bagian yang jernih dapat dibedakan dengan mudah; bagian iris sedikit tidak jelas/kabur.....	2
Bagian <i>nacrous</i> ; bagian iris tidak terlihat; ukuran pupil hampir tidak dapat dibedakan.....	3
Kornea gelap; iris tidak kelihatan.....	4
Iris	
Normal	0
<i>Rugae</i> terlihat jelas dan dalam, penyumbatan, pembengkakan <i>circumcorneal hyperaemia</i> , adanya tanda-tanda tersebut baik salah satu ataupun kombinasi; iris masih bereaksi terhadap cahaya (reaksi lambat dan buram).....	1
Tidak bereaksi terhadap cahaya, perdarahan, kerusakan yang nyata (salah satu atau kombinasi dari semua tanda tersebut).....	2
Konjungtiva	
Pembuluh darah normal (tidak ada kemerahan).....	0
Pembuluh darah mengalami pembesaran	1
Pembuluh darah merah tua, pembuluh darah tunggal sulit dibedakan.....	2
Warna merah darah tersebar merata.....	3
Khemosis/Udem (pada kelopak mata atau membran niktitan)	
Tidak ada pembengkakan/ normal.....	0
Sedikit pembengkakan diatas normal, termasuk membran niktitan	1
Pembengkakan terlihat jelas, sebagian pembengkakan terdapat di bagian dalam kelopak.....	2
Pembengkakan dengan setengah kelopak tertutup.....	3
Pembengkakan dengan lebih dari setengah kelopak tertutup.....	4

(OECD,2002)

4. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan uji harus memuat informasi berikut:

1. Dasar pemikiran untuk pengujian *in vivo*: bukti analisa dari data pengujian sebelumnya, meliputi hasil dari strategi rangkaian pengujian:
 - a. Deskripsi data relevan yang tersedia dari pengujian sebelumnya;
 - b. Data yang diperoleh pada tiap langkah strategi pengujian;
 - c. Deskripsi pengujian *in vitro* yang dilakukan, termasuk prosedur, hasil yang diperoleh.
2. Sediaan Uji:
 - a. Identifikasi data (misal: sumber, kemurnian, nomor bets);
 - b. Sifat fisika alami dan sifat fisiokimia (misal: pH, volatilitas, kelarutan, stabilitas);
 - c. Apabila berupa campuran, komposisi dan persentase relatif dari komponen.
3. Zat pembawa:
 - a. Identifikasi, konsentrasi (bila perlu), volume yang digunakan;
 - b. Alasan pemilihan zat pembawa.
4. Hewan Uji:
 - a. Spesies/jenis hewan yang digunakan, alasan pokok untuk menggunakan jenis hewan lain selain kelinci albino;
 - b. Jumlah hewan tiap jenis kelamin;
 - c. Umur tiap hewan pada permulaan pengujian;
 - d. Berat hewan pada awal dan akhir pengujian;
 - e. Sumber hewan, kondisi kandang, pakan, dan lain-lain.
5. Hasil Uji:
 - a. Deskripsi dari metode yang digunakan untuk membuat skor;
 - b. Data respon iritan/korosif dibuat dalam bentuk tabel;
 - c. Deskripsi dari derajat iritasi/korosi;
 - d. Deskripsi dari luka dalam mata seperti vaskularisasi, *pannus formation*, *adhesions*, derajat kemerahan;
 - e. Deskripsi dari derajat iritasi korosi, hasil histopatologi bila ada;
 - f. Deskripsi bila ada efek samping non ocular dan efek sistemik, histopatologikal bila perlu.
6. Pembahasan dan Kesimpulan.
7. Daftar Pustaka.

G. UJI IRITASI/KOROSI AKUT DERMAL

Uji iritasi/ korosi akut dermal adalah suatu uji pada hewan (kelinci albino) untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah paparan sediaan uji pada dermal sampai 4 jam. Prinsip uji iritasi/ korosi akut dermal adalah paparan sediaan uji dalam dosis tunggal pada kulit hewan uji dengan area kulit yang tidak diberi perlakuan berfungsi sebagai kontrol. Tujuan uji iritasi/ korosi akut dermal adalah untuk menentukan adanya efek iritasi pada kulit serta untuk menilai dan mengevaluasi karakteristik suatu zat apabila terpapar pada kulit.

Hasil uji dievaluasi berdasarkan kriteria bahaya dari *Globally Harmonised System (GHS) of The Classification and labelling of Chemical (2011)*, seperti pada Tabel 19. Kriteria tersebut digunakan terutama untuk mengkategorikan sediaan uji yang berbahaya/ toksik. Bila sediaan uji sudah diketahui mempunyai pH ekstrim ($\text{pH} \leq 2$ atau $\geq 11,5$), maka sediaan tersebut tidak boleh diuji pada hewan uji.

Tabel 19. Kriteria penggolongan sediaan uji yang bersifat korosif/iritan pada kulit

Kategori	Kriteria		
Kategori 1: Korosif		Korosif pada ≥ 1 dari 3 hewan	
(digunakan bila tidak menggunakan subkategori)	Subkategori korosif	Paparan	Pengamatan
Korosif	1A	≤ 3 menit	≤ 1 jam
	1B	> 3 menit sampai ≤ 1 jam	≤ 14 hari
	1C	>1 jam sampai ≤ 4 jam	≤ 14 hari
Kategori 2, Iritan	i. Skor rata-rata untuk eritema/udema $\geq 2,3$ sampai $\leq 4,0$ pada minimal 2 dari 3 hewan pada jam ke 24, 48 dan 72 setelah tambalan dilepaskan, atau bila reaksi terlambat, setelah paparan pengamatan selama 3 hari berturut-turut; atau ii. Inflamasi tidak sembuh sampai hari ke 14 minimal pada 2 ekor hewan uji, terjadi <i>alopecia</i> pada daerah tertentu, <i>hyperplasia</i> , <i>scaling</i> atau iii. Pada beberapa kasus ketika terdapat variabilitas respon yang jelas di hewan, dengan terdapat efek positif yang sangat pasti berkaitan dengan paparan sediaan uji di hewan tunggal tapi dengan kriteria yang luring dari kriteria diatas		
Kategori 3, Iritan ringan	Skor rata-rata untuk eritema/udema $\geq 1,5$ sampai $\leq 2,3$ pada jam ke 24, 48 dan 72, atau bila reaksi terlambat, setelah paparan, pengamatan selama 3 hari berturut-turut. (ketika tidak masuk ke kategori iritan diatas)		

(GHS, 2011)

Selain pengkategorian seperti Tabel 19, juga dapat dilakukan penilaian

terhadap sediaan uji yang mengakibatkan terjadinya reaksi kulit (ISO 10993-10), terutama untuk sediaan uji yang berupa obat-obatan atau kosmetik (Tabel 20). Nilai rata-rata dari kategori respon biasanya disebut sebagai Indeks Iritasi Primer.

Tabel 20. Kategori respon iritasi pada kelinci

Nilai Rata-rata	Kategori respon
0,0 – 0,4	Sangat ringan (<i>negligible</i>)
0,5 – 1,9	Iritan ringan (<i>slight</i>)
2,0 – 4,9	Iritan sedang (<i>moderate</i>)
5,0 – 8,0	Iritan kuat (<i>severe</i>)

(ISO 10993-10, 2010)

1. PRINSIP

Prinsip uji iritasi/ korosi akut dermal adalah paparan sediaan uji dalam dosis tunggal kepada kulit hewan uji dengan area kulit yang tidak diberi perlakuan berfungsi sebagai kontrol. Derajat iritasi/korosi dibaca dan dinilai dengan interval tertentu dan selanjutnya dijelaskan untuk memberikan evaluasi lengkap.

Derajat iritasi dinilai pada interval waktu tertentu yaitu pada jam ke 1, 24, 48 dan 72 setelah paparan sediaan uji. Untuk melihat reversibilitas, pengamatan dilanjutkan sampai 14 hari. Hewan yang menunjukkan tanda-tanda kesakitan atau penderitaan yang parah harus dikorbankan sesuai dengan prosedur pemusnahan hewan. Selain pengamatan terhadap iritasi, semua pengaruh zat toksik terhadap kulit, seperti *defatting of skin* (OECD TG 404-2002) dan pengaruh toksisitas lainnya serta berat badan harus dijelaskan dan dicatat. Pemeriksaan histopatologi perlu dipertimbangkan untuk menjelaskan respon yang meragukan.

Uji iritasi/korosi akut dermal dilakukan setelah semua data yang dapat diperoleh dari potensi iritasi/korosi kulit dievaluasi dengan analisis *weight-of-the-evidence* (WoE).

2. TUJUAN

Uji ini digunakan untuk menentukan adanya efek iritasi pada kulit serta untuk menilai dan mengevaluasi karakteristik suatu zat apabila terpapar pada kulit.

3. PROSEDUR

3.a. Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah kelinci albino jantan atau betina yang sehat dan dewasa, berat sekitar 2 kg. Penggunaan spesies lain dapat digunakan dengan justifikasi. Sebelum pengujian dimulai, hewan uji diaklimatisasi di ruang percobaan kurang lebih selama 5 hari dan hewan ditempatkan pada kandang individual (1 kandang untuk 1 ekor). Sekurang-kurangnya 24 jam sebelum pengujian, bulu hewan harus dicukur pada daerah punggung.

Beberapa strain kelinci memiliki bulu lebat yang lebih menonjol pada waktu-waktu tertentu dalam setahun. Area pertumbuhan rambut yang padat sebaiknya tidak digunakan sebagai lokasi pengujian.

3.b. Dosis Uji

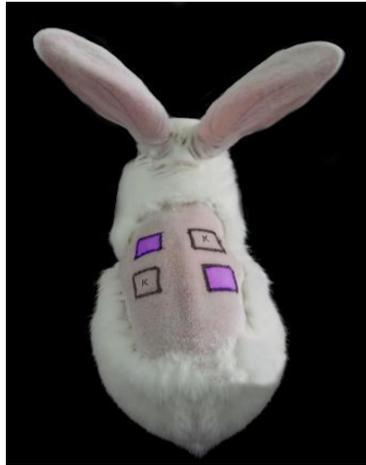
Dosis yang digunakan untuk sediaan uji cair adalah sebanyak 0,5 mL dan untuk sediaan uji padat atau semi padat sebanyak 0,5 g.

3.c. Cara Pemberian Sediaan Uji

Sediaan uji dipaparkan di area kulit seluas ± 6 (2 x 3) cm² dengan lokasi paparan seperti yang terlihat pada Gambar 12, kemudian lokasi paparan ditutup dengan kasa dan diplester dengan plester yang bersifat non-iritan. Plester harus dibuat longgar menggunakan balutan semi-oklusif yang sesuai selama periode paparan. Bila sediaan uji/bahan uji diaplikasikan ke plester, plester harus menempel pada kulit sedemikian rupa sehingga ada kontak yang baik dan distribusi bahan uji yang eragam pada kulit. Harus dicegah hewan dapat menghirup ataupun menelan bahan uji pada plester.

Jika pemberian secara langsung tidak memungkinkan (misalnya cairan atau pasta), sediaan uji harus dioleskan terlebih dahulu pada kassa lalu ditempelkan pada kulit. Sediaan uji cair tidak perlu diencerkan sedangkan sediaan uji padat dihaluskan lebih dulu dan dibasahi dengan sedikit air atau dengan pelarut yang cocok yang bersifat non-iritan untuk memastikan interaksi yang baik antara sediaan uji dengan kulit. Untuk pembawa selain air, potensi pengaruh dari pembawa harus seminimal mungkin.

Pada akhir periode paparan, (normalnya 4 jam), residu sediaan uji harus dihapus, dapat menggunakan air atau pelarut yang sesuai tanpa mengubah respon yang telah muncul atau integritas epidermis.



Gambar 12. Lokasi paparan sediaan uji
(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

3.d. Tahapan Uji

3.d.1. Uji pendahuluan (Uji in vivo iritasi dermal/korosi menggunakan satu hewan)

Bila sediaan uji dinilai korosif, mengiritasi, atau tidak dapat diklasifikasikan berdasarkan analisis *Weight of Evidence* (WoE), atau berdasarkan pengujian in vitro sebelumnya, maka pengujian in vivo lebih lanjut tidak diperlukan.

Namun dalam beberapa kasus dianggap perlu, uji in vivo dapat dilakukan dengan pada awal menggunakan satu hewan uji dan mengikuti pendekatan berikut. Dibuat tiga tempelan (*patch*) untuk tiga paparan, tempelan ke-1 dibuka setelah 3 menit, jika tidak terlihat reaksi kulit yang serius maka tempelan ke-2 ditempelkan pada tempat lain dan dibuka setelah 1 jam, jika paparan tidak mengakibatkan iritasi yang parah dan bisa dipaparkan hingga 4 jam, maka tempelan ke-3 ditempelkan dan dibuka pada jam ke-4, dan ditentukan gradasi cedera kulit.

Jika efek korosif tampak pada ketiga paparan, maka uji dihentikan. Bila efek korosif tidak teramati hingga paparan ketiga sudah dilepas, hewan diobservasi selama 14 hari, kecuali korosi muncul sebelum itu.

Pada kasus dimana sediaan uji tidak diekspektasikan bersifat korosi tapi mungkin dapat menyebabkan iritasi, tempelan tunggal diaplikasikan pada hewan selama 4 jam.

3.d.2. Uji konfirmasi (Uji iritasi dermal in vivo dengan hewan tambahan)

Bila efek korosif tidak teramati pada uji pendahuluan, maka respon iritasi/negatif harus dikonfirmasi dengan penambahan dua hewan uji lagi, masing-masing dengan satu tempelan selama 4 jam. Bila efek iritasi teramati

pada uji pendahuluan, uji konfirmasi dapat dilakukan secara berurutan atau dengan pemberian sediaan uji kepada dua hewan sekaligus. Pada beberapa kasus tertentu, dimana uji pendahuluan tidak dilakukan, dua atau tiga hewan diberikan satu tempelan dan dilepaskan setelah empat jam. Ketika digunakan dua hewan, dan keduanya menunjukkan hasil yang sama, tidak perlu dilakukan pengujian lanjutan. Bila kedua hasil berbeda maka dilakukan pengujian pada hewan ketiga. Respon yang meragukan mungkin perlu dievaluasi dengan menggunakan hewan tambahan.

3.e. Periode Pengamatan

Jangka waktu pengamatan harus mencukupi untuk mengevaluasi seluruh pengaruh reversibilitas yang teramati. Akan tetapi pengujian harus diakhiri saat hewan menunjukkan tanda-tanda kesakitan yang parah. Untuk menentukan reversibilitas, hewan harus diamati tidak kurang dari 14 hari setelah tempelan dibuka. Jika reversibilitas terlihat sebelum 14 hari, maka pengujian harus dihentikan saat itu juga.

3.f. Pengamatan Klinis dan Penilaian dari Reaksi Kulit

Semua hewan uji harus diamati ada atau tidaknya eritema dan edema, penilaian respon dilakukan pada jam ke 1, 24, 48, dan 72 setelah pembukaan tempelan (untuk sediaan uji yang tidak bersifat korosif/iritan Untuk uji pendahuluan pada satu hewan, pengamatan dilakukan segera setelah pembukaan tempelan. Jika kerusakan kulit tidak dapat diidentifikasi sebagai iritasi atau korosi pada jam ke 72, pengamatan dapat dilanjutkan sampai hari ke-14 untuk menentukan reversibilitas. Selain pengamatan terhadap iritasi, efek toksik setempat (*local toxic effect*), seperti *defatting of skin* dan pengaruh toksisitas lainnya dan berat badan harus dijelaskan dan dicatat. Pemeriksaan histopatologi perlu dipertimbangkan untuk menjelaskan respon yang meragukan.

Untuk menghindari subjektivitas dalam penilaian reaksi kulit/skoring, maka dilakukan oleh individu yang terlatih dan jika diperlukan dapat menggunakan ilustrasi gambar penilaian/skoring. Reaksi kulit dinilai berdasarkan Tabel dibawah ini dengan nilai maksimum adalah 4.

Tabel 21. Penilaian reaksi pada kulit

Pembentukan Eritema	Skor
Tidak ada eritema	0
Eritema yang sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan).....	1
Eritema terlihat jelas.....	2
Eritema sedang sampai parah.....	3
Eritema parah (merah daging) sampai pembentukan <i>eschar</i> yang menghambat penilaian eritema.....	4
Pembentukan Udema	
Tidak ada udema	0
Udema sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan).....	1
Udema kecil (batas area terlihat jelas).....	2
Udema tingkat menengah (luasnya bertambah sekitar 1 mm)....	3
Udema parah (luas bertambah lebih dari 1 mm dan melebar melebihi area paparan oleh sediaan uji).....	4

(OECD, 2015)

3.g. Analisis Data

Hasil pengamatan dirangkum dalam bentuk tabel yang memperlihatkan keadaan secara individual, memuat skor iritasi untuk eritema dan udema tiap hewan pada jam ke-1, 24, 48, dan 72 setelah tempelan dibuka.

3.h. Evaluasi hasil

Skor iritasi kulit yang harus dievaluasi adalah terhadap tingkat keparahan luka, ada atau tidaknya reversibilitas. Skor individu tidak mewakili standar absolut untuk sifat iritan dari sediaan uji. Dilakukan evaluasi efek-efek lain dari sediaan uji, skor individual harus dilihat sebagai nilai referensi.

Luka kulit yang bersifat reversibel harus diperhitungkan di dalam evaluasi respon iritan. Jika terlihat respon seperti *alopecia* (area terbatas), *hiperkeratosis*, *hiperplasia*, dan *scaling* yang bertahan sampai akhir dari pengamatan selama 14 hari, maka sediaan uji tersebut dimasukkan ke dalam kategori zat yang bersifat iritan. Disamping gambaran iritasi kulit, efek toksik lain yang disebabkan oleh bahan uji juga diamati dan dicatat.

Skor iritasi (Indeks Iritasi Primer) sediaan uji adalah kombinasi dari seluruh observasi dari pengujian. Indeks Iritasi Primer dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Indeks Iritasi Primer} = \frac{A - B}{C}$$

Keterangan :

A : Jumlah skor eritema dan edema seluruh titik pengamatan sampel pada jam ke 24, 48 dan 72 dibagi jumlah pengamatan

B : Jumlah skor eritema dan edema seluruh titik pengamatan kontrol pada jam ke 24, 48 dan 72 dibagi jumlah pengamatan

C : Jumlah hewan

Klasifikasi iritasi kulit dapat dilihat pada Tabel. 19 dan Tabel. 20 sesuai dengan kriteria yang akan digunakan.

3.i. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan uji harus memuat informasi berikut:

1. Dasar pemikiran untuk pengujian in vivo: bukti analisa dari data pengujian sebelumnya, meliputi hasil dari strategi rangkaian pengujian:
 - a. Deskripsi data relevan yang tersedia dari pengujian sebelumnya;
 - b. Data yang diperoleh pada tiap langkah strategi pengujian.
2. Sediaan Uji:
 - a. Identifikasi data (misal: sumber, kemurnian, nomer batch);
 - b. Sifat fisika alami dan sifat fisiokimia (misal: pH, volatilitas, kelarutan, stabilitas);
 - c. Apabila berupa campuran, komposisi dan persentase relatif dari komponen.
3. Zat pembawa:
 - a. Identifikasi, konsentrasi (bila perlu), volume yang digunakan;
 - b. Alasan pemilihan zat pembawa.
4. Hewan Uji:
 - a. Spesies/jenis hewan yang digunakan, alasan pokok untuk menggunakan jenis hewan lain selain kelinci albino;
 - b. Jumlah hewan tiap jenis kelamin;
 - c. Umur tiap hewan pada permulaan pengujian;
 - d. Berat hewan pada awal dan akhir pengujian;
 - e. Sumber hewan, kondisi kandang, pakan, dan lain-lain.
5. Kondisi pengujian:
 - a. Teknik persiapan area tempelan (pencukuran);
 - b. Rincian penggunaan bahan tempelan dan teknik pembuatan tempelan;

- c. Rincian preparasi, penggunaan, dan penghapusan sediaan uji.
6. Hasil Uji:
 - a. Skor eritema dan edema dibuat dalam bentuk tabel;
 - b. Deskripsi dari luka akibat paparan sediaan uji;
 - c. Deskripsi dari derajat iritasi korosi, hasil histopatologi bila ada;
 - d. Deskripsi bila ada efek samping lainnya.
 7. Pembahasan dan Kesimpulan.
 8. Daftar Pustaka.

H. UJI IRITASI MUKOSA VAGINA

Uji iritasi mukosa vagina adalah suatu uji yang digunakan untuk menguji sediaan uji yang kontak langsung dengan jaringan vagina dan tidak dapat diuji dengan cara lain. Prinsip uji iritasi mukosa vagina adalah sediaan uji dibuat ekstrak dalam larutan NaCl 0,9% atau minyak zaitun dan selanjutnya ekstrak dipaparkan ke dalam lapisan mukosa vagina hewan uji selama tidak kurang dari 5 kali paparan dengan selang waktu antar paparan (24 ± 2) jam. Selama paparan, jaringan mukosa vagina diamati dan diberi skor terhadap kemungkinan adanya eritema, eksudat dan edema. Setelah selesai paparan hewan uji dikorbankan dan diambil jaringan mukosa vaginanya untuk dievaluasi secara histopatologi. Tujuan uji iritasi mukosa vagina adalah untuk mengevaluasi keamanan dari sediaan uji yang kontak dengan mukosa vagina.

Uji iritasi mukosa vagina hanya digunakan untuk menguji sediaan uji yang kontak langsung dengan jaringan vagina dan tidak dapat diuji dengan cara lain. Sediaan uji yang terbukti mengiritasi kulit dan mata atau bahan yang mempunyai $\text{pH} \leq 2$ atau $\geq 11,5$ tidak perlu diuji, dan langsung dikategorikan sebagai bahan potensial yang bersifat iritasi terhadap vagina.

1. PRINSIP

Sediaan uji dibuat ekstrak dalam larutan NaCl 0,9% atau minyak zaitun dan selanjutnya ekstrak dipaparkan ke dalam lapisan mukosa vagina hewan uji selama tidak kurang dari 5 kali paparan dengan selang waktu antar paparan (24 ± 2) jam. Selama paparan, jaringan mukosa vagina diamati dan diberi skor terhadap kemungkinan adanya eritema, eksudat dan edema. Setelah selesai paparan hewan uji dikorbankan dan diambil jaringan mukosa vaginanya untuk dievaluasi secara histopatologi.

2. TUJUAN

Uji ini digunakan untuk mengevaluasi keamanan dari sediaan uji yang kontak dengan mukosa vagina.

Peringatan

Uji iritasi mukosa vagina tidak perlu dilakukan dalam keadaan dimana:

- a. Sediaan uji sudah dapat diprediksi bersifat korosif berdasarkan struktur kimia atau sifat fisiko kimia, misalnya asam ($\text{pH} \leq 2$) atau basa kuat ($\text{pH} \geq 11,5$)
- b. Sediaan uji telah terbukti bersifat korosif atau iritan kuat pada uji iritasi kulit
- c. Terdapat data dari studi lain yang relevan dan dapat dipercaya yang menunjukkan bahan uji akan menimbulkan iritasi serupa bila diuji pada mukosa

3. PROSEDUR

3.a. Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah kelinci albino betina yang sehat dan dewasa. dengan galur yang sama, bobot sekitar 2 kg, jumlah hewan tidak kurang dari 6 ekor (3 ekor untuk uji, 3 ekor untuk kontrol). Bila hasil uji meragukan, pengujian sebaiknya diulang dengan jumlah hewan yang sama. Hewan ditempatkan pada kandang individual (satu kandang untuk satu hewan). Sebelum pengujian dimulai, hewan uji diaklimatisasi di ruang percobaan kurang lebih selama 5 hari dan dilakukan pemeriksaan pada lapisan mukosa vagina terhadap adanya kelainan seperti pembengkakan atau infeksi, iritasi, dan luka. Hewan tidak boleh digunakan apabila terlihat gejala-gejala tersebut. Hewan dalam kondisi siklus estrus tidak boleh digunakan dalam pengujian untuk menghindari adanya reaksi positif palsu.

3.b. Penyiapan Sediaan Uji

Sediaan uji dibuat secara aseptis di dalam lemari aseptis, bahan uji yang berbentuk:

- Bubuk; dilarutkan dalam pelarut yang inert
- Cairan; langsung diaplikasikan atau diencerkan dengan pelarut yang inert
- Film, pipa/tabung, lempeng dan elastomer dapat dilihat pada Tabel 17. Jika luas daerah sampel tidak dapat ditentukan, maka digunakan 100 mg elastomer atau 200 mg plastik atau bahan lain untuk setiap 20 mL cairan ekstraksi. Media ekstraksi dapat menggunakan larutan NaCl fisiologis dan

atau minyak zaitun. Ekstraksi dilakukan dengan cara pemanasan campuran bahan dan media dalam oven pada suhu 50 °C selama 72 ± 2 jam atau dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 60 menit. Kemudian ekstrak didekantasi dan disimpan pada suhu kamar (30 °C). Ekstrak digunakan maksimal 24 jam setelah ekstraksi. Terhadap kontrol dilakukan hal yang sama.

3.c. Cara Pemberian Sediaan Uji

Sejumlah 1 mL sediaan uji dipaparkan pada lapisan mukosa hewan uji menggunakan kateter atau spuit injeksi dengan sonde tumpul. Dilakukan 5 kali paparan berturut-turut dengan selang waktu (24 ± 2) jam. Hal yang sama dilakukan terhadap hewan kontrol menggunakan media ekstraksi. Jika hewan uji mengeluarkan urin, maka pemberian larutan uji diulang 10 menit kemudian.

3.d. Pengamatan

Pada (24 ± 2) jam setelah paparan sediaan uji yang ke 1, 2, 3, 4 dan 5 diamati jaringan vaginal dengan cara membuka vagina dan perineum untuk melihat adanya eritema, eksudat dan edema. Bila ditemui adanya eritema, eksudat dan edema yang parah, maka hewan langsung dikorbankan dengan cara yang sesuai dengan prosedur pembunuhan hewan uji, serta diperiksa jaringan vaginal secara mikroskopis, maka pengujian dianggap selesai. Uji dihentikan saat ditemukan eritema atau edema yang parah meskipun waktu pengujian (5 hari) belum tercapai. Bila tidak ditemukan eritema, eksudat dan edema yang parah uji dapat dilanjutkan sampai hari ke 5. Kondisi hewan uji seperti kematian, tanda-tanda keracunan, perubahan perilaku diamati dan dicatat setiap hari sepanjang periode penelitian, berat badan sebelum dan sesudah pengujian dicatat.

3.e. Penilaian

Kelinci dikorbankan dengan cara diinjeksi pada dosis letal menggunakan sodium pentobarbital (24 ± 2) jam setelah dosis akhir diberikan. Kemudian vagina kelinci diambil dengan hati-hati dan dibuka secara longitudinal, diperiksa terhadap kongesti vaskuler, tanda-tanda iritasi umum dan luka pada lapisan epitel. Pemotongan dilakukan di daerah vagina, serviks, dan korpus uteri secara membujur dan melintang lalu potongan tersebut dimasukkan dalam larutan dapar formalin 10%, atau larutan fiksasi yang sesuai selanjutnya dibuat preparat histopatologi sebagaimana yang tercantum dalam

Bab IV huruf BB atau sesuai dengan metode yang valid dan sah. Kemudian preparat histopatologi dievaluasi secara mikroskopik, dinilai pengaruh iritasi dengan menggunakan pedoman pada Tabel 22.

Tabel 22. Sistem klasifikasi mikroskopik terhadap reaksi jaringan vagina

Reaksi	Skor
Sel Epitel	
Normal, utuh	0
Degenerasi sel, <i>flattening</i>	1
Metaplasia	2
Erosi fokal	3
Erosi diseluruh permukaan	4
Infiltrasi leukosit (perbidang pandang)	
Tidak ada infiltrasi	0
Minimal, kurang dari 25	1
Ringan, 26 – 50	2
Sedang, 51 – 100	3
Berat, lebih dari 100	4
Kongesti vaskuler	
Tidak ada kongesti	0
Minimal	1
Ringan	2
Sedang	3
Tampak jelas, disertai kerusakan pembuluh darah	4
Udema	
Tidak ada udema	0
Minimal	1
Ringan	2
Sedang	3
Tampak jelas, disertai dengan kerusakan pembuluh darah.....	4

(ISO 10993-10:2010)

3.f. Analisis Data

Indeks Iritasi dari hasil penilaian mikroskopis dihitung dan diklasifikasikan berdasarkan panduan ISO 10993-10:2010 (Tabel 23).

Tabel 23. Indeks iritasi mukosa vagina

Nilai Rata-rata	Klasifikasi
0	Bukan iritan (<i>none</i>)
1 – 4	Iritan sangat ringan (<i>minimal</i>)
5 – 8	Iritan ringan (<i>mild</i>)
9 – 11	Iritan sedang (<i>moderate</i>)
12 – 16	Iritan kuat (<i>severe</i>)

(ISO 10993-10:2010)

Indeks iritasi dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Nilai indeks iritasi} = A - B$$

Keterangan

A: Nilai rata-rata iritasi kelompok perlakuan yaitu jumlah nilai evaluasi secara mikroskopis dari semua hewan perlakuan dibagi jumlah hewan kelompok perlakuan

B: Nilai rata-rata iritasi kelompok kontrol yaitu jumlah nilai evaluasi secara mikroskopis dari semua hewan kontrol dibagi jumlah hewan kelompok kontrol

3.g. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan uji harus memuat informasi berikut:

1. Dasar pemikiran untuk pengujian in vivo: bukti analisis dari data pengujian sebelumnya, meliputi hasil dari strategi rangkaian pengujian:
 - a. Deskripsi data relevan yang tersedia dari pengujian sebelumnya;
 - b. Data yang diperoleh pada tiap langkah strategi pengujian.
2. Sediaan Uji:
 - a. Identifikasi data (misal: sumber, kemurnian, nomor batch);
 - b. Sifat fisika alami dan sifat fisikokimia (misal: pH, volatilitas, kelarutan, stabilitas);
 - c. Apabila berupa campuran, komposisi dan persentase relatif dari komponen.
3. Zat pembawa:
 - a. Identifikasi, konsentrasi (bila perlu), volume yang digunakan;
 - b. Alasan pemilihan zat pembawa.
4. Hewan Uji:
 - a. Spesies/jenis hewan yang digunakan, alasan pokok untuk menggunakan jenis hewan lain selain kelinci albino;
 - b. Jumlah hewan tiap jenis kelamin;
 - c. Umur tiap hewan pada permulaan pengujian;
 - d. Berat hewan pada awal dan akhir pengujian;
 - e. Sumber hewan, kondisi kandang, pakan, dan lain-lain.
5. Hasil Uji:
 - a. Deskripsi dari metode yang digunakan untuk membuat skor;
 - b. Data respon iritan/korosif dibuat dalam bentuk tabel;
 - c. Deskripsi dari derajat iritasi/korosi;
 - d. Deskripsi dari penilaian makropatolog seperti eritema, eksudat dan udema;

- e. Deskripsi dari derajat iritasi korosi terhadap sel epitel, infiltrasi leukosit, kongesti vaskular, dan edema dari hasil histopatologi.
6. Pembahasan dan Kesimpulan.
7. Daftar Pustaka.

I. UJI TOKSISITAS AKUT DERMAL

Uji toksisitas akut dermal adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah paparan suatu sediaan uji dalam sekali pemberian melalui rute dermal. Prinsip uji toksisitas akut dermal adalah beberapa kelompok hewan uji menggunakan satu jenis kelamin dipapar dengan sediaan uji dengan dosis tertentu, dosis awal dipilih berdasarkan hasil uji pendahuluan. Selanjutnya dipilih dosis yang memberikan gejala toksisitas tetapi yang tidak menyebabkan gejala toksik berat atau kematian. Tujuan uji toksisitas akut dermal adalah untuk mendeteksi toksisitas intrinsik suatu zat, memperoleh informasi bahaya setelah paparan suatu zat melalui kulit secara akut dan untuk memperoleh informasi awal yang dapat digunakan untuk menetapkan tingkat dosis dan merancang uji toksisitas selanjutnya serta untuk menetapkan nilai LD₅₀ suatu zat, penentuan penggolongan zat, menetapkan informasi pada label dan informasi absorpsi pada kulit.

Uji toksisitas akut dermal menggunakan hewan percobaan diperlukan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah paparan suatu sediaan uji dalam sekali pemberian melalui rute dermal. Hasil toksisitas akut dermal dievaluasi seperti pada evaluasi uji toksisitas akut oral.

1. PRINSIP

Beberapa kelompok hewan uji dengan satu jenis kelamin diberikan sediaan uji secara topikal dengan dosis sesuai dengan bagan uji sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf JJ dan KK. Dosis awal dipilih berdasarkan hasil uji penentuan rentang dosis (*range-finding study*), selanjutnya dipilih dosis awal untuk uji utama (*main study*). Hewan yang sekarat atau menunjukkan gejala toksisitas berat segera dikorbankan sesuai prosedur pembunuhan hewan uji dan datanya dianggap sebagai hewan mati. Kelompok berikutnya diberikan sediaan uji dengan dosis lebih tinggi atau lebih rendah tergantung ada tidaknya gejala toksisitas dan kematian. Pengujian dilanjutkan sampai ditemukan dosis yang menyebabkan toksisitas yang nyata atau tidak lebih dari 1 ekor hewan yang mati, atau ketika tidak ada efek yang terlihat pada dosis

tertinggi atau kematian muncul pada dosis terendah kemudian hasil uji terhadap sediaan uji diklasifikasikan menurut GHS.

2. TUJUAN

Tujuan uji toksisitas akut dermal adalah untuk mendeteksi toksisitas intrinsik suatu zat, memperoleh informasi bahaya setelah paparan suatu zat melalui kulit secara akut dan untuk memperoleh informasi awal yang dapat digunakan untuk menetapkan tingkat dosis dan merancang uji toksisitas selanjutnya serta untuk menetapkan nilai LD₅₀ suatu zat, penentuan penggolongan zat, menetapkan informasi pada label dan informasi absorpsi pada kulit.

3. PROSEDUR (*Fixed Dose Procedure*)

3.a. Hewan Uji dan Jumlah

Hewan yang umumnya lebih dipilih untuk digunakan adalah tikus. Syarat hewan uji adalah dewasa muda, sehat. Berat badan untuk tikus adalah 200-300 g dengan variasi berat badan tidak lebih dari 20% dari rata-rata berat badan. Hewan yang digunakan hanya yang berkulit sehat. Ketika tidak ada informasi yang cukup terkait toksisitas senyawa uji, direkomendasikan menggunakan satu hewan uji untuk penelitian penentuan rentang dosis. Uji utama menggunakan 2 hewan. Lebih disarankan menggunakan hewan betina karena lebih sensitif. Jika tersedia informasi toksikologi atau toksikokinetik sehubungan struktur kimia sediaan uji yang lebih sensitif terhadap hewan jantan, maka hewan jantan dapat digunakan. Hewan betina yang digunakan harus belum pernah beranak (*nulliparous*) dan tidak sedang bunting.

3.b. Penyiapan Hewan Uji

Sebelum pengujian dimulai, hewan uji diaklimatisasi di ruang percobaan selama 5-7 hari. Hewan dikelompokkan secara acak sedemikian rupa sehingga penyebaran berat badan merata untuk semua kelompok dengan variasi berat badan tidak melebihi 20% dari rata-rata berat badan. Hewan ditempatkan pada kandang individual (1 kandang untuk 1 ekor). Sesaat sebelum pengujian, bulu hewan dicukur dengan luas area tidak kurang dari 10% dari permukaan tubuh untuk tempat paparan sediaan uji. Pencukuran dimulai dari area tulang belikat (bahu) sampai tulang pangkal paha (tulang pinggang) dan setengah bagian sisi perut kiri dan kanan. Pencukuran dilakukan kira-kira 24 jam sebelum pemberian sediaan uji. Ketika mencukur, hindari luka atau

pengelupasan pada kulit karena dapat menyebabkan kenaikan/penurunan permeabilitas kulit, kecuali jika pengelupasan kulit merupakan bagian dari persyaratan dalam pengujian. Pengulangan pencukuran dilakukan dalam jangka waktu satu minggu. Pada proses pencukuran dapat digunakan anestetik untuk membantu penanganan hewan dan meminimalkan stress hewan.

3.c. Penyiapan Sediaan uji

Sediaan uji dilarutkan dengan bahan pembawa yang sesuai. Bila zat uji berbentuk padat, maka zat tersebut dibuat serbuk dan kemudian dibasahi dengan air atau pembawa (minyak nabati) yang sesuai sehingga dapat menempel pada kulit. Bila digunakan pembawa selain air, maka kemungkinan pengaruh pembawa berpenetrasi pada kulit perlu dipertimbangkan. Jumlah pembawa yang digunakan harus dicatat (umumnya 0,5 – 1 mL sudah cukup). Zat berupa larutan tidak perlu diencerkan.

3.d. Cara Pemberian Sediaan Uji

Bahan uji diberikan secara merata pada 10% dari seluruh permukaan kulit tubuh. Bila sediaan uji bersifat toksik, maka paparan sediaan uji tidak perlu 10 % dari area permukaan kulit. Sediaan uji dipaparkan dengan tipis dan merata. Untuk menjaga sediaan uji tetap menempel pada kulit, area paparan ditutup dengan kasa berpori dan dibalut dengan perban elastis serta plester yang tidak mengiritasi selama 24 jam. Setelah selesai periode paparan, sisa bahan uji yang masih menempel pada kulit dihilangkan dengan air atau pelarut yang sesuai.

3.e. Uji Penentuan Rentang Dosis Uji

Uji penentuan rentang dosis dilakukan bila tidak ada informasi atau informasi terkait toksisitas senyawa uji tidak memadai. Penentuan rentang dosis dimulai dari menggunakan satu hewan uji dengan pemberian dosis awal, dianjurkan menggunakan dosis 200 mg/kg berat badan sesuai dengan bagan uji pendahuluan sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf JJ. Studi utama akan dilakukan menurut hasil dari penentuan uji rentang dosis, contoh:

- Bila hewan yang diberi dosis awal 200 mg/kg berat badan mati maka ditambahkan satu hewan uji yang diberi dosis 50 mg/kg berat badan . Bila hewan kedua mati maka senyawa uji dimasukkan ke kategori GHS

- 1, bila tidak terdapat kematian atau ada gejala toksisitas, maka dosis awal uji utama yang digunakan adalah 200 mg/kg berat badan
- Bila hewan uji yang diberi dosis awal 200 mg/kg menunjukkan gejala toksisitas atau tidak terdapat kematian, maka ditambahkan satu hewan uji yang diberikan dosis 1000 mg/kg berat badan . Bila hewan tersebut mati maka dosis awal uji utama yang digunakan adalah 200 mg/kg berat badan , tetapi bila tidak terdapat kematian atau ada gejala toksisitas maka ditambahkan satu hewan uji lagi yang diberi dosis 2000 mg/kg berat badan . Bila hewan tersebut mati maka dosis awal uji utama yang digunakan adalah 1000 mg/kg berat badan , dan bila tidak terdapat kematian atau ada gejala toksisitas, maka dosis awal uji utama yang digunakan adalah 2000 mg/kg berat badan

3.f. Uji Utama

Dosis awal uji utama didasarkan dari hasil uji penentuan rentang dosis. Jumlah hewan yang digunakan adalah 2 hewan uji untuk setiap dosis. Alur penelitian dan penentuan klasifikasi GHS dapat dilihat sesuai dengan bagan uji pendahuluan sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf KK.

3.g. Pengamatan

- a. Periode pengamatan; dilakukan selama tidak kurang dari 14 hari. Namun lamanya pengamatan tersebut dapat diperpanjang sesuai reaksi yang timbul akibat paparan sediaan uji.
- b. Penilaian klinis; dilakukan secara individual terhadap adanya perubahan pada bulu, mata, membran mukosa, sistem pernafasan, sistem peredaran darah, sistem saraf otonom, sistem saraf pusat, aktivitas somamotor, dan pola tingkah laku. Adanya gejala-gejala toksisitas lainnya seperti gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, tertidur dan koma, waktu kematian dicatat seteliti mungkin.
- c. Bobot badan; terhadap berat badan harus dilakukan penimbangan sesaat sebelum diberi perlakuan dan selama seminggu setelahnya, serta pada saat hewan sekarat. Pada akhir pengujian, berat badan hewan yang bertahan hidup dicatat sebelum hewan dikorbankan.
- d. Perubahan patologi; dilakukan nekropsi terhadap semua hewan yang hidup dan diamati adanya perubahan makropatologi. Pemeriksaan secara mikroskopik dilakukan terhadap organ yang menunjukkan adanya perubahan secara makro.

3.h. Pengumpulan dan Analisis Data

3.h.1. Pengumpulan Data

Data masing-masing hewan harus tersedia dan semua data harus diringkas dalam bentuk tabel yang menunjukkan dosis uji yang digunakan; jumlah hewan yang menunjukkan gejala toksisitas; jumlah hewan yang ditemukan mati selama uji dan yang mati karena sekarat (keadaan *moribound*).

3.h.2. Analisis Data

Nilai LD₅₀ dihitung dengan regresi linear/probit atau metode statistik lainnya. Semua hewan yang mati, baik yang mati dengan sendirinya atau yang mati dalam keadaan *moribound* digabungkan jumlahnya untuk penghitungan nilai LD₅₀.

3.i. Interpretasi hasil

Pengujian toksisitas akut dengan rute dermal (perkutan) dan penentuan LD₅₀ dermal dapat menunjukkan perkiraan toksisitas relatif dari bahan uji. Perkiraan hasil uji toksisitas dermal akut dan nilai LD₅₀ pada hewan ke manusia dapat dipercaya hanya pada batas tertentu (*limited degree*). Hasil dari pengujian toksisitas dermal akut harus dihubungkan dengan data penelitian toksisitas akut dari rute lain.

3.j. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Rasionalitas dari pengujian *in vivo*: analisis bobot bukti dari data yang sudah ada :
 - a. Penjelasan data relevan yang tersedia sebelum pengujian;
 - b. Data yang diturunkan dari setiap tahap strategi uji;
 - c. Analisis bobot bukti dari studi *in vivo*.
2. Senyawa uji
 - a. Sumber, nomor lot, batas penggunaan, bila tersedia;
 - b. Stabilitas dari senyawa uji, bila diketahui;
 - c. Solubilitas dan stabilitas dari senyawa uji dalam pembawa, bila diketahui.
 - Senyawa konstituen tunggal
Penampilan fisik dan karakteristik fisikokimia yang relevan; identifikasi kimia seperti IUPAC atau nama CAS, nomor CAS, SMILES atau kode InChI, rumus kimia; kemurnian; identitas kimia dari pengotor.

- Senyawa multi-konstituen, UVCBs (*Substances of unknown or variable composition, complex reaction products, and biological materials*) dan campuran.

Karakterisasi dari identifikasi kimia; kejadian kuantitatif dan sifat fisikokimia dari konstituen dan campuran.

3. Pembawa (disesuaikan)

Justifikasi tujuan penggunaan pembawa dan justifikasi pemilihan pembawa (selain air).

4. Hewan Uji

- a. Spesies/galur;
- b. Status mikrobiologi hewan, bila diketahui;
- c. Jumlah, usia, jenis kelamin;
- d. Sumber, kondisi kandang, diet, data historis dll;
- e. Detail dari makanan dan minuman (termasuk tipe dan sumber diet, sumber air);
- f. Metode randomisasi dalam pemilihan hewan.

5. Kondisi pengujian

- a. Detail dari formulasi senyawa uji, termasuk detail terkait bentuk fisik senyawa uji yang diberikan ke hewan;
- b. Detail dari pemberian senyawa uji dan tempat pemberian termasuk volume dosis, luas area aplikasi dan lamanya paparan;
- c. Rasionalisasi dari pemilihan dosis awal.

6. Hasil

- a. Tabulasi dari data respon dan tingkat dosis setiap hewan (yaitu: hewan menunjukkan gejala toksisitas termasuk kematian, keparahan dan durasi efek)
- b. Berat badan individual hewan pada hari dipaparkan, dihitung pula dengan interval tiap minggu, serta pada waktu kematian atau euthanasia
- c. Perjalanan waktu timbulnya toksisitas dan apakah efek tersebut reversibel pada tiap hewan
- d. Hasil nekropsi dan histopatologi tiap hewan, bila tersedia :
Penilaian kriteria Draize, bila dilakukan; dan prosedur interpretasi data

7. Diskusi dan interpretasi hasil

8. Kesimpulan

J. UJI TOKSISITAS SUBKRONIS DERMAL

Uji toksisitas subkronis dermal adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan melalui rute dermal pada hewan uji selama sebagian umur hewan, tetapi tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan.

Prinsip uji toksisitas subkronis dermal adalah sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari selama waktu tertentu yang dipaparkan melalui kulit pada beberapa kelompok hewan uji. Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama periode pemberian sediaan uji, bila belum melewati periode *rigor mortis* (kaku) segera dinekropsi, organ dan jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup dinekropsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ maupun jaringan, serta dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis, histopatologi.

Tujuan uji toksisitas subkronis dermal adalah untuk mendeteksi efek toksik zat yang belum terdeteksi pada uji toksisitas akut dermal, mendeteksi efek toksik setelah paparan sediaan uji melalui kulit secara berulang dalam jangka waktu tertentu, mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas setelah paparan sediaan uji melalui kulit secara berulang dalam jangka waktu tertentu.

1. PRINSIP

Sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan secara topikal setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji. Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama periode pemberian sediaan uji, bila belum melewati periode *rigor mortis* (kaku) segera dinekropsi, organ dan jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup dinekropsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ maupun jaringan, serta dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis, histopatologi.

2. TUJUAN

Untuk memperoleh informasi adanya:

- a. Efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut dermal.

- b. Efek toksik setelah paparan sediaan uji melalui kulit secara berulang dalam jangka waktu tertentu.
- c. Dosis yang tidak menimbulkan efek toksik (NOAEL).
- d. Mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas setelah paparan sediaan uji melalui kulit secara berulang dalam jangka waktu tertentu.

3. JENIS UJI TOKSISITAS SUBKRONIS DERMAL:

- a. Uji Toksisitas Subkronis Singkat Dermal 28 hari

Uji toksisitas subkronis dermal 28 hari digunakan untuk menguji sediaan uji yang penggunaannya dalam bentuk sekali pakai atau berulang dalam waktu kurang dari satu minggu.

- b. Uji Toksisitas Subkronis Dermal 90 hari

Uji toksisitas subkronis dermal 90 hari digunakan untuk menguji sediaan uji yang penggunaannya secara klinis berulang dalam waktu 1-4 minggu.

4. PROSEDUR

4.a. Hewan Uji dan Jumlah

4.a.1. Toksisitas Subkronis Dermal 28 Hari

Hewan yang umumnya lebih dipilih untuk digunakan adalah tikus. Syarat hewan uji adalah sehat, berat badan untuk tikus 200-300 g. Masing-masing kelompok dosis menggunakan hewan minimal 10 yang terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina untuk setiap kelompok dosis dan hewan betina yang digunakan harus belum pernah beranak dan tidak sedang bunting. Bila diperlukan kelompok interim (misalnya 3 hewan per jenis kelamin per kelompok), jumlah hewan ditambahkan sesuai dengan jumlah yang akan dikorbankan. Selain itu pada kelompok dosis tinggi dibuat kelompok tambahan/satelit minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 jantan dan 5 betina. Pengamatan reversibilitas, persistensi, atau efek toksik tertunda pada kelompok satelit dilakukan selama 14 hari setelah pemberian sediaan uji.

4.a.2. Toksisitas Subkronis Dermal 90 hari

Hewan yang umumnya lebih dipilih untuk digunakan adalah tikus. Syarat hewan uji adalah sehat, berat badan untuk tikus adalah 200-300 g. Masing-masing kelompok dosis menggunakan hewan minimal 20 yang terdiri dari 10 ekor jantan dan 10 ekor betina untuk setiap kelompok dosis dan hewan betina yang digunakan harus belum pernah beranak dan tidak sedang

bunting. Bila diperlukan kelompok interim (misalnya 3 hewan per jenis kelamin per kelompok), jumlah hewan ditambahkan sesuai dengan jumlah yang akan dikorbankan. Selain itu dibuat juga kelompok satelit minimal 20 hewan yang terdiri dari 10 jantan dan 10 betina untuk kelompok dosis tinggi. Pengamatan reversibilitas, persistensi, atau efek toksik tertunda pada kelompok satelit dilakukan selama 28 hari setelah pemberian sediaan uji.

4.b. Dosis Uji

Pengujian harus dilakukan terhadap sekurang-kurangnya 3 kelompok dosis, 1 kelompok kontrol dan kelompok satelit (kelompok dosis tinggi), serta bila diperlukan ditambahkan kelompok interim (kelompok kontrol dan semua dosis). Dosis bahan uji yang paling tinggi harus menimbulkan efek toksik tetapi tidak menimbulkan kematian atau gejala toksisitas yang berat; dosis menengah menimbulkan gejala toksik yang lebih ringan sedangkan dosis yang paling rendah tidak menimbulkan gejala toksik (NOAEL). Jika pemberian sediaan uji menyebabkan iritasi kulit yang parah, maka konsentrasinya dapat dikurangi, meskipun mengakibatkan pengurangan efek toksik pada tingkat dosis tinggi. Jika kulit telah terluka parah pada awal pengujian, maka pengujian harus dihentikan dan pengujian diulang dengan konsentrasi sediaan uji yang lebih rendah.

4.c. Batas Uji

Bila pada dosis 1000 mg/kg berat badan tidak dihasilkan efek toksik, dosis tidak perlu dinaikkan lagi, meskipun dosis yang diharapkan untuk manusia belum tercapai.

4.d. Penyiapan Hewan Uji

Sebelum pengujian dimulai, hewan uji diaklimatisasi di ruang percobaan selama 5-7 hari. Hewan dikelompokkan secara acak sedemikian rupa sehingga penyebaran berat badan merata untuk semua kelompok dengan variasi berat badan tidak lebih 20% dari rata-rata berat badan. Hewan ditempatkan pada kandang individual (1 kandang untuk 1 ekor). Sesaat sebelum pengujian, bulu hewan dicukur dengan luas area tidak kurang dari 10% dari permukaan tubuh untuk tempat paparan sediaan uji. Pencukuran dimulai dari area tulang belikat (bahu) sampai tulang pangkal paha (tulang pinggang) dan setengah bagian sisi perut kiri dan kanan. Pencukuran dilakukan kira-kira 24 jam sebelum pemberian sediaan uji. Ketika mencukur, hindari luka atau

pengelupasan pada kulit karena dapat menyebabkan kenaikan/penurunan permeabilitas kulit, kecuali jika pengelupasan kulit merupakan bagian dari persyaratan dalam pengujian. Pengulangan pencukuran dilakukan dalam jangka waktu satu minggu. Pada proses pencukuran dapat digunakan anestetik untuk membantu penanganan hewan dan meminimalkan stress hewan.

4.e. Penyiapan Sediaan uji

Untuk sediaan uji yang berupa cairan tidak perlu dilarutkan, sedangkan sediaan uji yang berbentuk padat harus dihaluskan dan dibasahi dengan air atau zat pembawa yang sesuai untuk memastikan adanya interaksi yang baik antara sediaan uji dengan kulit. Apabila menggunakan larutan pembawa maka harus dipertimbangkan bahwa zat tersebut tidak bersifat toksik atau tidak berpenetrasi ke dalam kulit. Jumlah pembawa yang digunakan harus dicatat (umumnya 0,5 – 1 mL sudah cukup).

4.f. Cara Pemberian Sediaan Uji

Sediaan uji dipaparkan pada 10 % dari luas permukaan tubuh hewan uji selama tidak kurang dari 6 jam per hari, selanjutnya ditutup dengan selaput tipis (*dressing*) dan dibalut dengan pembalut elastis yang tidak mengiritasi kulit dan dapat menahan debu serta mempertahankan zat uji tetap menempel pada kulit. Setelah 6 jam paparan, sediaan uji segera dibersihkan dari kulit. Hewan uji harus dipastikan tidak dapat memakan sediaan uji dan pembalut elastis tidak menghambat pergerakan hewan uji.

4.g. Waktu Pemberian Sediaan Uji

a. Toksisitas Subkronis Dermal 28 Hari

Sediaan uji diberikan setiap hari, 7 hari dalam seminggu selama 28 hari.

b. Toksisitas Subkronis Dermal 90 Hari

Sediaan uji diberikan setiap hari, 7 hari dalam seminggu selama 90 hari.

4.h. Pengamatan

Pengamatan dilakukan setiap hari meliputi terjadinya gejala-gejala toksik dan gejala klinis yang berupa perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa, pernapasan, sirkulasi, sistem otonom, sistem saraf pusat, aktivitas somatomotor, dan perubahan perilaku (seperti perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh misalnya berjalan mundur). Gejala toksik tersebut dicatat saat

mulai terjadi gejala, tingkat keparahan dan waktu sembuhnya. Hewan yang hampir mati sebaiknya dipindahkan kemudian dikorbankan, dan waktu kematian dicatat, bila memungkinkan dinekropsi. Selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ maupun jaringan, serta dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis, dan histopatologi. Pada akhir pengujian, semua hewan uji yang hidup baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan harus dikorbankan dan selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ maupun jaringan, serta dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis, dan histopatologi.

Pada uji subkronis dermal 90 hari, jika sediaan uji akan diaplikasikan di area yang berisiko kontak dengan mata maka perlu dilakukan pemeriksaan oftalmologi dengan menggunakan oftalmoskop atau peralatan setara yang sesuai, yang dilakukan sebelum paparan dan pada akhir pengujian. Pemeriksaan setidaknya dilakukan pada kelompok dosis tinggi dan kelompok kontrol. Jika perubahan mata terdeteksi maka semua hewan harus diperiksa.

4.i. Lama Pengamatan

a. Toksisitas Subkronis Dermal 28 Hari

Pengamatan dilakukan selama 28 hari, sedangkan untuk kelompok satelit pengamatan dilanjutkan sampai 14 hari kemudian, namun tanpa pemberian sediaan uji untuk mendeteksi proses penyembuhan kembali dari pengaruh toksik.

b. Toksisitas Subkronis Dermal 90 Hari

Pengamatan dilakukan selama 90 hari, sedangkan untuk kelompok satelit pengamatan dilanjutkan sampai 28 hari kemudian, namun tanpa pemberian sediaan uji untuk mendeteksi proses penyembuhan kembali dari pengaruh toksik.

4.j. Monitoring Berat Badan dan Konsumsi Pakan

a. Hewan; berat badan hewan ditimbang

- Sesaat sebelum pemberian sediaan uji.
- Setiap seminggu sekali.
- Pada saat terjadi kematian

b. Pakan; jumlah pakan ditimbang setiap minggu

4.k. Pengambilan Darah

Pada akhir percobaan, sebelum hewan dikorbankan, hewan dipuasakan

semalaman. Prosedur pengambilan darah dilakukan sesuai dengan ketentuan umum. Sebanyak 0,5 mL darah dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus yang telah diisi antikoagulan (EDTA) sebanyak 10 µl untuk pemeriksaan hematologi, sebanyak 0,5 mL darah untuk pembuatan apusan darah menggunakan alat hematospiner untuk penetapan deferensial leukosit. Sisanya dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) selama 10 menit, kemudian dipindahkan ke dalam tangas es tidak lebih dari 20 menit dan segera disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan dalam lemari beku (-20°C) untuk pemeriksaan biokimia klinis.

4.1. Pemeriksaan Hematologi

Pemeriksaan hematologi yang harus dilakukan meliputi: konsentrasi hemoglobin, jumlah eritrosit, jumlah leukosit, hematokrit, parameter fungsi pembekuan darah (seperti: waktu pembekuan, *prothrombin time*, *thromboplastin time*, atau jumlah platelet), dan perhitungan tetapan darah yaitu: MCV, MCH, MCHC dan penetapan deferensial leukosit. Pemeriksaan hematologi dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf J dan K atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

4.m. Pemeriksaan Biokimia Klinis

Pemeriksaan biokimia klinis yang dilakukan meliputi: kalsium, fosfor, klorida, natrium, kalium, glukosa puasa, GOT, GPT, *ornithine decarboxylase*, *gamma glutamil transferase*, nitrogen urea, albumin, kreatinin, total bilirubin, total protein serta pemeriksaan lain yang diperlukan seperti analisis lipid (misalnya total kolesterol, trigliserida), hormon, keseimbangan asam/basa, methaemoglobin dan aktivitas kolinesterase. Sedangkan menurut WHO, pemeriksaan biokimia klinis meliputi: fungsi hati (GOT, GPT, Gamma GT (GGT)) dan fungsi ginjal (nitrogen urea, kreatinin, total-bilirubin). Parameter utama minimum yang harus diperiksa adalah glukosa, total kolesterol, trigliserida, GPT, GOT, nitrogen urea dan kreatinin. Pemeriksaan biokimia klinis dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf L - AA atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

Urinalisis hanya dilakukan jika terdapat indikasi berdasarkan toksisitas yang diharapkan atau diamati.

4.n. Pengamatan Makropatologi

Hewan yang telah dikorbankan harus segera dinekropsi dan dilakukan pengamatan secara makropatologi secara seksama untuk setiap organ.

4.o. Penimbangan Organ

Organ yang akan ditimbang harus dikeringkan terlebih dahulu dengan kertas penyerap, kemudian segera ditimbang untuk mendapatkan bobot organ absolut. (Penimbangan pada sekurang-kurangnya 5 organ utama yaitu hati, limpa, jantung, ginjal, paru dan ditambah organ sasaran yang diketahui secara spesifik). Bobot organ relatif dapat diperoleh dengan rumus berikut:

$$\text{Bobot organ relatif} = \frac{\text{bobot organ absolut}}{\text{bobot badan}}$$

4.p. Pemeriksaan Histopatologi

Organ yang diperiksa secara histopatologi meliputi: semua lesi makropatologi, otak (termasuk bagian medula/pons, korteks cerebellar dan korteks cerebral), pituitari, tiroid/paratiroid, timus, paru-paru, jantung, aorta, kelenjar ludah, hati, ginjal, limpa, adrenal, pankreas, kelenjar gonad, organ aksesoris kelamin, kantong empedu (jika ada), kerongkongan, lambung, usus 12 jari, jejunum, ileum, sekum, kolon, rektum, kandung kemih, limfo nodus dan saraf tepi. Organ berikut hanya diperiksa jika diindikasikan oleh gejala toksisitas atau keterlibatan organ target, antara lain: trakea, kelenjar susu (pada hewan betina), otot paha, mata, tulang dada dengan sumsum tulang, tulang paha, sumsum tulang belakang (pada tiga tingkat - serviks, toraks tengah dan lumbar), dan kelenjar lakrimal eksorbital. Atau pemeriksaan histopatologi sekurang-kurangnya dilakukan pada 5 organ utama yaitu hati, limpa, jantung, ginjal, paru dan ditambah organ sasaran yang diketahui secara spesifik. Organ-organ kecil seperti pituitari, tiroid, adrenal yang tidak memungkinkan untuk dibuat preparat histopatologi dapat diabaikan. Setiap organ dan jaringan yang sudah dipisahkan segera dimasukkan dalam larutan dapar formaldehida 10% atau larutan fiksasi yang sesuai dan dibuat preparat histopatologi) kemudian diperiksa menggunakan mikroskop. Pembuatan preparat histopatologi dapat mengacu sebagaimana yang tercantum dalam Bab IV huruf BB atau sesuai dengan metode yang valid dan sah.

4.q. Evaluasi Hasil

Kajian yang dilakukan antara lain: evaluasi hubungan dosis dan efek yang terjadi untuk semua kelompok yaitu terjadinya efek toksik dan derajat toksisitas, yang meliputi perubahan berat badan, gejala klinis, parameter hematologi, biokimia klinis, makropatologi dan histopatologi, organ sasaran, kematian dan efek umum lain atau efek yang spesifik.

4.r. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Tinjauan Pustaka
3. Metode:
 - a. Jenis hewan dan galur yang digunakan;
 - b. Nama, bentuk dan cara pemberian sediaan uji.
4. Hasil
 - a. Efek toksik yang terjadi untuk setiap dosis dan jenis kelamin;
 - b. Waktu terjadinya gejala-gejala toksik dan kematian;
 - c. Dosis yang tidak menimbulkan efek toksik (NOAEL);
 - d. Data berat badan dan makanan yang konsumsi;
 - e. Hasil pemeriksaan hematologi;
 - f. Hasil pemeriksaan biokimia klinis;
 - g. Penemuan hasil pemeriksaan makropatologi dan histopatologi;
 - h. Bobot organ absolut dan relative;
 - i. Analisa statistik antara lain menggunakan ANOVA atau metode lain yang sesuai.
5. Pembahasan
6. Kesimpulan
7. Daftar Pustaka

K. UJI KARSINOGENISITAS

Uji karsinogenisitas adalah suatu pengujian untuk mendeteksi dan memperoleh informasi/ mengidentifikasi sifat karsinogenik sediaan uji setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan pada hewan uji selama sebagian besar rentang hidup hewan tersebut sesuai dengan rute pemberian yang diinginkan.

Prinsip uji karsinogenisitas adalah sediaan uji pada beberapa tingkat dosis

diberikan kepada beberapa kelompok hewan selama sebagian besar rentang hidup hewan tersebut sesuai dengan rute pemberian yang diinginkan. Hewan diamati dengan seksama terhadap tanda-tanda toksisitas dan perkembangan lesi neoplastik. Hewan yang mati selama pengujian dikorbankan dan dinekropsi. Hewan yang masih hidup sampai akhir penelitian dikorbankan dan dinekropsi.

Tujuan uji karsinogenisitas adalah untuk memperoleh informasi/mengidentifikasi sifat karsinogenik suatu bahan yang menyebabkan peningkatan kejadian neoplasma, peningkatan proporsi neoplasma ganas atau penurunan waktu munculnya neoplasma; mengidentifikasi organ target karsinogenisitas; mengidentifikasi waktu munculnya neoplasma; mengkarakterisasi hubungan dosis-respon tumor; mengidentifikasi NOAEL (*no-observed-adverse-effect level*) atau nilai awal penentuan *Benchmark Dose* (BMD); mengekstrapolasi efek karsinogenik ke tingkat paparan manusia dosis rendah; penyediaan data untuk menguji hipotesis mengenai mekanisme kerja.

1. PRINSIP

Sediaan uji pada beberapa tingkat dosis diberikan kepada beberapa kelompok hewan selama sebagian besar rentang hidup hewan tersebut sesuai dengan rute pemberian yang diinginkan. Hewan diamati dengan seksama terhadap tanda-tanda toksisitas dan perkembangan lesi neoplastik. Hewan yang mati selama pengujian dikorbankan dan dinekropsi. Hewan yang masih hidup sampai akhir penelitian dikorbankan dan dinekropsi.

2. TUJUAN

Uji karsinogenisitas bertujuan untuk memperoleh informasi/mengidentifikasi sifat karsinogenik suatu bahan yang menyebabkan peningkatan kejadian neoplasma, peningkatan proporsi neoplasma ganas atau penurunan waktu munculnya neoplasma; mengidentifikasi organ target karsinogenisitas; mengidentifikasi waktu munculnya neoplasma; mengkarakterisasi hubungan dosis-respon tumor; mengidentifikasi NOAEL (*no-observed-adverse-effect level*) atau nilai awal penentuan *Benchmark Dose* (BMD); mengekstrapolasi efek karsinogenik ke tingkat paparan manusia dosis rendah; penyediaan data untuk menguji hipotesis mengenai mekanisme kerja.

Uji karsinogenisitas memberikan informasi tentang kemungkinan bahaya kesehatan yang mungkin muncul dari paparan berulang untuk periode yang berlangsung hingga seluruh umur spesies yang digunakan. Penelitian akan memberikan informasi tentang efek toksik dari zat tersebut termasuk potensi

karsinogenisitas, dan mungkin menunjukkan organ target dan kemungkinan akumulasi. Hal ini dapat memberikan perkiraan tentang nilai NOAEL (*no-observed-adverse-effect level*) dan dalam kasus karsinogen non-genotoksik, untuk respon tumor, dapat digunakan untuk menetapkan kriteria keamanan pada paparan manusia. Sangat diperlukan pengamatan klinis yang cermat terhadap hewan, untuk mendapatkan informasi sebanyak mungkin.

3. PERTIMBANGAN AWAL

Dalam penilaian dan evaluasi potensi karsinogenisitas, semua informasi tentang bahan uji harus dipertimbangkan oleh peneliti sebelum melakukan studi, untuk memfokuskan desain penelitian agar lebih efisien dalam menguji potensi karsinogenik dan meminimalkan penggunaan hewan. Informasi mengenai mekanisme kerja sediaan uji yang diduga karsinogen sangat penting, desain optimal mungkin berbeda tergantung pada apakah zat tersebut diketahui atau diduga merupakan karsinogen genotoksik.

Informasi yang akan membantu dalam desain penelitian meliputi identitas, struktur kimia, dan sifat fisika-kimia dari bahan uji; hasil uji *in vitro* atau *in vivo* terkait toksisitas termasuk uji genotoksisitas; penggunaan yang diantisipasi dan potensi paparan manusia; tersedia data (Q)SAR, uji mutagenisitas/genotoksisitas, data karsinogenisitas dan data toksikologi senyawa lain yang berhubungan secara struktur dengan bahan uji; data toksikokinetik yang tersedia (dosis tunggal dan juga kinetika dosis berulang jika tersedia) dan data yang berasal dari studi keterpaparan berulang lainnya. Uji karsinogenisitas harus dilakukan setelah informasi awal tentang toksisitas diperoleh dari dosis berulang pada uji toksisitas 28 hari dan/ atau 90 hari. Uji inisiasi-promosi kanker jangka pendek juga dapat memberikan informasi yang berguna. Pendekatan pengujian bertahap untuk uji karsinogenisitas harus dipertimbangkan sebagai bagian dari penilaian keseluruhan potensi terhadap efek kesehatan yang merugikan dari bahan uji tertentu.

Harus digunakan metode statistik yang paling sesuai untuk analisis hasil, mengingat desain eksperimental dan tujuan, harus ditetapkan sebelum memulai studi. Masalah yang perlu dipertimbangkan diantaranya apakah statistik harus mencakup penyesuaian untuk waktu bertahan hidup, analisis risiko tumor kumulatif relatif untuk durasi kelangsungan hidup, analisis waktu untuk tumor dan analisis jika terjadi penghentian prematur pada satu

atau lebih kelompok.

Pengenalan, penilaian dan penggunaan tanda klinis secara manusiawi perlu diperhatikan dalam pelaksanaan uji karsinogenisitas. Dalam penelitian yang melibatkan dosis berulang, ketika suatu hewan menunjukkan tanda-tanda klinis yang progresif, yang semakin memperburuk kondisinya, keputusan yang diinformasikan, apakah akan membunuh hewan secara manusiawi atau tidak harus dibuat. Keputusan harus mempertimbangan nilai informasi yang akan diperoleh dari pemeliharaan berkelanjutan hewan yang diteliti relatif terhadap kondisi keseluruhannya. Jika keputusan dibuat untuk tetap melanjutkan penelitian, maka frekuensi pengamatan harus ditingkatkan, sesuai kebutuhan. Atau dapat juga dilakukan tanpa merugikan mempengaruhi tujuan tes, untuk sementara menghentikan dosis atau mengurangi dosis uji jika akan menghilangkan rasa sakit.

Pertimbangan harus diberikan untuk menggabungkan uji toksisitas kronis dan uji karsinogenisitas. Penggabungan uji memberikan efisiensi yang lebih besar dalam hal waktu dan biaya dibandingkan melakukan dua studi terpisah, tanpa mengorbankan kualitas data baik pada fase kronis atau fase karsinogenisitas. Namun pertimbangan yang cermat harus diberikan pada prinsip pemilihan dosis ketika melakukan penggabungan uji toksisitas kronis dan uji karsinogenisitas. Penggabungan uji dapat dilakukan merujuk pada OECD TG 453 (2018).

4. PROSEDUR

4.a. Hewan Uji dan Jumlah

Pengujian karsinogenisitas dapat menggunakan hewan uji rodensia. Penggunaan hewan uji non-rodensia dapat dipertimbangkan jika data yang tersedia menunjukkan bahwa hewan tersebut lebih relevan untuk memprediksi efek kesehatan pada manusia. Hewan uji rodensia yang umum digunakan adalah tikus atau mencit. Kriteria hewan yang digunakan adalah dewasa muda, sehat, jenis kelamin jantan dan/ atau betina tergantung pada prediksi jenis kanker pada studi sebelumnya atau informasi pustaka. Pemberian dosis harus dimulai sesegera mungkin setelah penyapihan dan aklimatisasi serta sebaiknya sebelum hewan uji berusia 8 minggu. Menggunakan galur yang sama yang digunakan pada uji toksisitas sebelumnya. Apabila galur sebelumnya tidak dapat bertahan hidup dalam jangka waktu yang lama, harus

dipertimbangkan menggunakan galur yang dapat bertahan hidup dalam jangka waktu yang lama. Hewan uji betina harus nullipara dan tidak bunting. Hewan uji yang digunakan harus seragam spesies, galur, sumber, berat dan umurnya.

Ruangan yang digunakan untuk percobaan hendaknya memenuhi persyaratan suhu, kelembaban, cahaya dan kebisingan yang sesuai dengan kebutuhan hidup hewan uji, yaitu suhu ruangan diatur menjadi $22^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, dengan kelembaban relatif 30–70% atau diatur sebesar 50–60%, dan penerangan 12 jam terang 12 jam gelap. Ruangannya harus selalu dijaga kebersihannya. Hewan diberi pakan yang sesuai standar laboratorium dan diberikan tanpa batas (*ad libitum*).

Makanan harus memenuhi semua persyaratan nutrisi dari spesies yang diuji dan kandungan kontaminan makanan harus serendah mungkin, termasuk namun tidak terbatas pada residu pestisida, polutan organik yang persisten, fitoestrogen, logam berat dan mikotoksin yang mungkin mempengaruhi hasil pengujian. Informasi mengenai nutrisi dan tingkat kontaminasi makanan harus dilakukan secara berkala, setidaknya pada awal pengujian dan bila ada perubahan dalam batch yang digunakan, harus dimasukkan dalam laporan akhir. Informasi mengenai air minum yang digunakan dalam penelitian juga harus disediakan. Pilihan makanan mungkin dipengaruhi oleh kebutuhan untuk memastikan campuran yang sesuai dari sediaan uji ketika sediaan uji diberikan melalui makanan.

Digunakan sekurang-kurangnya 3 (tiga) kelompok dosis untuk sediaan uji dan 1 kelompok kontrol, tiap kelompok uji dan kontrol terdiri dari minimal 50 ekor setiap jenis kelamin. Sesuai dengan tujuan studi, dapat meningkatkan kekuatan statistik dengan mengalokasikan hewan secara berbeda ke berbagai kelompok dosis, misalnya dengan lebih dari 50 hewan dalam kelompok dosis rendah untuk memperkirakan potensi karsinogenik potensial pada dosis rendah. Tingkatan dosis umumnya didasarkan pada hasil uji toksisitas berulang jangka pendek atau rentang dosis pilihan dan harus mempertimbangkan data toksikologi serta data toksikokinetik bahan uji sebelumnya. Terdapat interim analisis dan kelompok satelit/ *sentinel* yang jumlahnya dipertimbangkan pada saat perhitungan jumlah hewan uji. Jumlah hewan uji yang dilakukan interim analisis adalah 10 hewan/ jenis kelamin.

4.b. Hewan Uji dan Jumlah

Pemilihan bahan pembawa sediaan uji harus mempertimbangkan pengaruh

bahan pembawa terhadap efek absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi dari sediaan uji; karena efek bahan pembawa kadang-kadang dapat mempengaruhi karakteristik toksik dari sediaan uji. Bahan pembawa yang digunakan tidak boleh mempunyai efek terhadap karsinogenisitas. Selain air, karakteristik toksisitas pembawa harus diketahui. Informasi lain juga harus tersedia yaitu stabilitas sediaan uji dan homogenitas larutan dosis atau makanan (yang sesuai) pada kondisi pemberian (misalnya, pemberian melalui makanan).

Kelompok kontrol haruslah kelompok yang tidak diberi perlakuan atau kelompok pengendali bahan pembawa sediaan uji. Kelompok kontrol harus menerima pembawa dalam volume tertinggi yang digunakan di antara kelompok dosis. Jika sediaan uji diberikan dalam makanan, dan menyebabkan asupan makanan berkurang secara signifikan karena berkurangnya palatabilitas diet, kelompok kontrol tambahan dengan pakan rendah mungkin berguna.

Apabila sediaan uji diberikan melalui pakan atau air minum, penting untuk memastikan bahwa jumlah sediaan uji yang diberikan tidak mengganggu nutrisi normal atau keseimbangan air, dengan konsentrasi sediaan uji tidak melebihi 5% dari total pakan, untuk menghindari ketidakseimbangan nutrisi. Waktu pemberian pakan, konsentrasi pakan konstan (mg/kg diet atau ppm) atau tingkat dosis konstan dalam hal berat badan hewan (mg/kg berat badan), yang dihitung setiap minggu, dapat digunakan. Alternatif lainnya harus ditentukan.

4.c. Pemberian Sediaan Uji dan Dosis

Sediaan uji umumnya diberikan secara oral. Cara lain yang digunakan yaitu topikal, inhalasi, dan lain-lain seperti pemakaian yang lazim digunakan pada manusia. Pemilihan rute pemberian disesuaikan dengan sifat fisik dan kimia bahan uji dan rute utama paparan pada manusia. Sediaan harus diberikan setiap kali pada saat yang lebih kurang sama waktunya. Uji karsinogenisitas melibatkan paparan melalui rute dermal atau inhalasi mungkin juga diperlukan untuk penilaian risiko kesehatan manusia dan/atau mungkin diperlukan dalam hal regulasi tertentu, kedua rute paparan melibatkan kompleksitas teknis yang cukup besar yang uji nya perlu dirancang berdasarkan kasus per kasus.

Untuk kepentingan kesejahteraan hewan, rute pemberian oral biasanya dipilih

hanya untuk sediaan uji yang metode administrasi ini cukup mewakili potensi paparan manusia (misalnya obat-obatan). Untuk bahan kimia makanan atau lingkungan termasuk pestisida, pemberian biasanya melalui pakan atau air minum. Namun, untuk beberapa skenario, misalnya, paparan pada pekerjaan, administrasi melalui rute lain mungkin lebih tepat.

Jika sediaan uji diberikan menggunakan sonde, harus dilakukan dengan menggunakan sonde lambung atau kanula intubasi yang sesuai, pada waktu yang sama setiap hari. Biasanya satu dosis diberikan sekali sehari; apabila sediaan uji merupakan iritan lokal, maka dapat dipertahankan tingkat dosis harian dengan memberikannya sebagai dosis terpisah (dua kali sehari). Volume cairan maksimal yang dapat diberikan dalam satu waktu tergantung dari ukuran hewan uji. Volume harus dijaga serendah mungkin dan biasanya tidak melebihi 1 mL/100 g berat badan untuk hewan pengerat. Variabilitas dalam volume pengujian harus diminimalkan dengan mengatur konsentrasi untuk memastikan volume konstan pada semua tingkatan dosis. Zat yang berpotensi korosif atau iritan perlu diencerkan untuk menghindari efek lokal yang parah. Menguji pada konsentrasi yang cenderung korosif atau mengiritasi saluran gastrointestinal harus dihindari.

Kelompok dosis dan tingkatan dosis

Dalam pemilihan dosis, peneliti juga harus mempertimbangkan dan memastikan bahwa data yang dihasilkan memadai untuk memenuhi persyaratan sebagaimana mestinya (misalnya, penilaian risiko dan bahaya, klasifikasi dan pelabelan, penilaian ED, dll.)

Dalam memilih tingkat dosis yang tepat, keseimbangan harus dicapai antara skrining bahaya di satu sisi dan karakterisasi respons pada dosis rendah dan relevansinya. Dosis tertinggi biasanya harus dipilih untuk mendapatkan informasi target organ dan bukti-bukti toksisitas yang ditimbulkan, sementara harus juga dipertimbangkan untuk menghindari penderitaan, toksisitas parah, morbiditas, atau kematian. Dengan mempertimbangkan faktor-faktor yaitu dosis tertinggi biasanya harus dipilih untuk mendapatkan bukti toksisitas, dengan syarat, misalnya, depresi bertambahnya berat badan (kurang lebih 10%). Namun, apabila dosis tersebut menimbulkan efek samping yang sangat berpengaruh pada masa hidup dan berat badan hewan uji maka dipilih dosis di bawah dosis tertinggi yang menyebabkan efek toksik tersebut.

Tingkatan dosis dan perbedaan tingkatan dosis dapat dipilih untuk menentukan dosis-respon yang tergantung pada mekanisme kerja bahan uji, nilai NOAEL atau hasil lain dari penelitian, misalnya BMD pada tingkat dosis terendah. Faktor yang harus diperhatikan dalam menetapkan dosis rendah adalah kemiringan kurva dosis-respons yang diharapkan, dosis dimana perubahan penting dapat terjadi dalam metabolisme atau mekanisme toksik di mana ambang batas yang diharapkan, atau di mana titik awal untuk ekstrapolasi dosis rendah yang diharapkan.

Perbedaan tingkatan dosis sangat bergantung pada karakteristik bahan uji dan tidak dapat dicantumkan dalam Pedoman, tetapi interval dua hingga empat kali lipat seringkali memberikan hasil yang baik. Secara umum, penggunaan interval yang lebih besar dari 10 kali lipat harus dihindari, dan harus dengan alasan yang kuat apabila dilakukan.

Beberapa hal yang perlu dipertimbangkan dalam pemilihan dosis yaitu sebagai berikut:

- Adanya *nonlinearity* atau dugaan *nonlinearity* atau titik belok dalam kurva dosis-respons;
- Toksikokinetik dan rentang dosis di mana terjadi induksi metabolit, saturasi, atau *nonlinearity* antara dosis eksternal dan internal dapat terjadi atau tidak terjadi;
- Lesi prekursor, efek penanda, atau indikator proses biologis mendasar;
- Mekanisme toksisitas yang terjadi, seperti dosis dimana sitotoksitas terjadi, kadar hormon terganggu, mekanisme homeostasis yang tidak stabil;
- Wilayah kurva dosis-respon di mana estimasi yang kuat diperlukan, misalnya, dalam kisaran BMD yang diantisipasi atau ambang batas yang diduga;
- Pertimbangan antisipasi tingkat paparan pada manusia.

4.d. Pelaksanaan Uji

- a. Sebelum pengujian dimulai hewan diaklimatisasi dalam ruang percobaan selama tidak kurang dari 1 minggu.
- b. Hewan uji harus secara acak dimasukkan ke dalam kelompok kontrol dan perlakuan. Setelah randomisasi, tidak ada perbedaan yang signifikan dalam rata-rata berat badan antar kelompok di dalam setiap jenis kelamin. Jika terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik, maka langkah

randomisasi harus diulangi, jika memungkinkan. Setiap hewan harus diberi nomor identifikasi unik, dan diberi tanda secara permanen dengan metode yang sesuai.

- c. Hewan uji dapat dipelihara secara individual atau secara berkelompok (kelompok kecil) dengan jenis kelamin yang sama. Pada saat dimulainya uji, variasi bobot untuk tiap jenis kelamin hewan yang digunakan harus minimal dan tidak melebihi $\pm 20\%$ dari berat rata-rata semua hewan uji, secara terpisah untuk setiap jenis kelamin.
- d. Setidaknya terdapat 3 (tiga) tingkat dosis yang berbeda dan kelompok kontrol. Tingkatan dosis umumnya akan didasarkan pada hasil uji toksisitas subkronis atau temuan pada studi sebelumnya serta harus mempertimbangkan data toksikologi dan toksikokinetik untuk sediaan uji terkait.
- e. Dalam rute pemberian oral, hewan uji diberi sediaan uji setiap hari (tujuh hari per minggu), biasanya untuk jangka waktu 24 bulan untuk tikus dan 18 bulan untuk mencit. Pemberian selama lima hari per minggu perlu didasari justifikasi. Dalam rute pemberian dermal, hewan uji diperlakukan dengan sediaan uji setidaknya selama 6 jam per hari, 7 hari per minggu untuk jangka waktu 24 bulan. Paparan melalui rute inhalasi dilakukan selama 6 jam per hari, 7 hari per minggu, tetapi paparan selama 5 hari per minggu juga dapat digunakan, jika didasari justifikasi. Periode paparan biasanya akan berlangsung selama 24 bulan. Jika spesies hewan rodensia selain tikus hanya dipaparkan pada hidung saja, durasi maksimum paparan dapat disesuaikan untuk meminimalkan cekaman/*distres* pada spesies tersebut. Diperlukan justifikasi apabila durasi paparan kurang dari 6 jam per hari.
- f. Durasi uji biasanya 24 bulan untuk tikus, mewakili mayoritas rentang hidup normal hewan yang akan digunakan. Durasi uji yang lebih pendek atau lebih lama dapat digunakan, tergantung pada masa hidup galur dan spesies hewan yang digunakan, tetapi harus didasari justifikasi yang jelas. Untuk galur tertentu mencit, misalnya, durasi uji yang lebih tepat untuk galur AKR/J, C3H/J atau C57BL/6J mungkin 18 bulan.
- g. Semua hewan harus diperiksa morbiditas atau mortalitasnya, biasanya pada awal dan akhir setiap hari, termasuk pada akhir pekan dan hari libur. Hewan juga harus diperiksa sekali sehari terhadap tanda-tanda spesifik yang berkaitan dengan toksikologi, dengan mempertimbangkan waktu terjadinya efek toksik yang diantisipasi setelah pemberian dosis sediaan uji

dalam pemberian oral. Perhatian khusus harus diberikan pada perkembangan tumor; dan waktu terjadinya tumor, lokasi, dimensi, penampilan, dan perkembangan masing-masing tumor yang sangat terlihat atau teraba harus dicatat.

- h. Jika didasari justifikasi ilmiah yang kuat, maka uji mungkin memerlukan *interim kills* yaitu pengorbanan hewan uji pada waktu tertentu (misalnya pada 12 bulan) untuk mendapatkan informasi mengenai perkembangan perubahan neoplastik atau informasi mekanistik lainnya. Apabila informasi tersebut sudah tersedia dari studi toksisitas dosis berulang sebelumnya, maka justifikasi melakukan *interim kills* tidak dapat diterima. Jika *interim kills* diperhitungkan dalam desain uji, maka jumlah hewan dalam setiap kelompok dosis harus ditambahkan sesuai dengan jumlah hewan uji yang dijadwalkan untuk *interim kills*, yaitu biasanya 10 hewan per jenis kelamin. Selain itu, kelompok tambahan yang disebut sebagai kelompok hewan *sentinel* (biasanya 5 hewan per jenis kelamin) dapat dimasukkan untuk memantau status penyakit, jika diperlukan. Kelompok satelit (jika ada) dikorbankan pada 1 bulan setelah pemberian sediaan uji dihentikan.
- i. Beberapa panduan tentang durasi, penghentian studi dan kelangsungan hidup hewan (*survival*) adalah sebagai berikut:
- Penghentian studi harus dipertimbangkan ketika jumlah hewan yang bertahan hidup di kelompok dosis rendah atau kelompok kontrol lebih rendah dari 25 %.
 - Dalam kasus di mana hanya kelompok dosis tinggi yang mati sebelum waktunya (karena toksisitas), maka hal ini tidak memicu penghentian studi.
 - Kelangsungan hidup (daya tahan) setiap jenis kelamin harus dipertimbangkan secara terpisah.
 - Studi tidak boleh diperpanjang melebihi titik waktu ketika data studi tidak lagi cukup untuk menghasilkan evaluasi statistik yang sah.

4.e. Pengamatan

Semua hewan harus diperiksa morbiditas atau mortalitasnya, biasanya pada awal dan akhir setiap hari, termasuk pada akhir pekan dan hari libur. Hewan juga harus diperiksa sekali sehari terhadap tanda-tanda spesifik yang berkaitan dengan toksikologi, dengan mempertimbangkan waktu terjadinya efek toksik yang diantisipasi setelah pemberian dosis sediaan uji dalam pemberian oral. Perhatian khusus harus diberikan pada perkembangan tumor;

dan waktu terjadinya tumor, lokasi, dimensi, penampilan, dan perkembangan masing-masing tumor yang sangat terlihat atau teraba harus dicatat

4.f. Monitoring Berat Badan dan Konsumsi Pangan

Semua hewan uji harus ditimbang pada awal perlakuan, setidaknya seminggu sekali untuk 13 minggu pertama, dan setidaknya setiap bulan setelahnya. Pengukuran konsumsi pakan dan minum dan efisiensi pakan harus dilakukan setidaknya setiap minggu selama 13 minggu pertama dan setidaknya setiap bulan setelahnya. Pengukuran konsumsi air minum perlu dipertimbangkan apabila studi mempengaruhi aktivitas tersebut.

4.g. Pemeriksaan Hematologi, Biokimia Klinis dan Pemeriksaan Lainnya

Pemeriksaan darah dan biokimia klinis diperlukan untuk memaksimalkan informasi yang diperoleh dari uji, terutama dalam mempertimbangkan mekanisme kerja bahan uji. Pemeriksaan urin juga dapat dilakukan.

Sampel darah yang dikoleksi (misalnya dari jantung atau dari sinus retro-orbital mata dengan anestesi) harus disimpan dalam kondisi yang sesuai. Preparat apusan darah juga dapat disiapkan untuk beberapa pemeriksaan, terutama apabila sumsum tulang diperkirakan menjadi organ target, meskipun nilai pemeriksaan tersebut untuk penilaian potensi karsinogenik masih dipertanyakan.

4.h. Pengamatan Makropatologi

Nekropsi perlu dilakukan pada semua hewan kecuali hewan *sentinel* dan hewan satelit. Pemeriksaan makropatologi dilakukan secara terperinci yang meliputi pemeriksaan eksternal permukaan tubuh, semua lubang (*orifices*), dan rongga tengkorak, dada, dan perut serta isinya. Pemeriksaan makropatologi pada hewan *sentinel* dan hewan satelit dilakukan sesuai kebutuhan kasus per kasus.

Berat organ biasanya bukan merupakan bagian dari uji karsinogenesitas, karena perubahan berat organ pada usia lanjut dan adanya perkembangan tumor dapat membuat bias. Berat organ dapat menjadi pertimbangan bila diperlukan, terutama saat mempertimbangkan mekanisme kerja bahan uji. Pada kelompok satelit, data berat organ yang harus dikoleksi adalah data pada waktu kurang dari 1 tahun sejak uji dimulai.

Beberapa jaringan dibawah ini harus difiksasi dalam medium fiksasi yang paling tepat berdasarkan jenis jaringan dan pemeriksaan histopatologi yang akan dilakukan.

Tabel 24. Jaringan yang diawetkan dalam uji karsinogenisitas

Semua lesi kasar	Jantung	Pankreas	Lambung (<i>forestomach</i> , <i>glandular stomach</i>)
Kelenjar adrenal	Ileum	Kelenjar paratiroid	[gigi]
Aorta	Jejunum	Saraf perifer	Testis
Otak (termasuk potongan cerebrum, cerebellum dan medulla/pons)	Ginjal	Pituitari	Timus
Sekum	Kelenjar lakrimal	Prostat	Tiroid
Serviks	Hati	Rektum	[lidah]
Kelenjar aksesoris reproduksi jantan	Paru-paru	Kelenjar saliva	Trakea
Usus	Nodus limfa (baik superficial maupun dalam)	Vesikula seminalis	Kelenjar urin
Duodenum	Kelenjar susu (wajib untuk betina dan apabila memungkinkan untuk jantan)	Otot skeletal	Uterus (termasuk serviks)
Epididimis	[saluran napas atas, termasuk hidung, turbinat dan sinus paranasal]	Kulit	[ureter]
Mata (termasuk retina)	Esophagus	Sumsum tulang belakang	[uretra]

* Jaringan dengan tanda kurung siku bersifat pilihan

Dalam kasus organ berpasangan, misalnya ginjal, adrenal, kedua organ tersebut harus difiksasi. Temuan klinis dan temuan lainnya mungkin mengindikasikan perlunya memeriksa jaringan tambahan. Organ tertentu yang

dianggap menjadi target berdasarkan sifat yang diketahui dari sediaan uji juga harus difiksasi. Dalam studi yang melibatkan rute dermal, perlu ditambah koleksi kulit di area pemberian sediaan uji. Dalam studi yang melibatkan rute pemberian inhalasi, daftar organ sebagaimana ditetapkan dalam daftar organ untuk uji sediaan oral harus diperiksa ditambah dengan organ-organ di saluran pernafasan.

4.i. Pemeriksaan Histopatologi

Jaringan minimal yang diperiksa secara histopatologi meliputi:

- a. Semua jaringan dari kelompok dosis tinggi dan kelompok kontrol.
- b. Semua jaringan hewan yang *moribound* atau mati selama penelitian.
- c. Semua jaringan yang menunjukkan kelainan makroskopik termasuk tumor.
- d. Ketika perubahan histopatologi (terkait sediaan uji) ditemukan pada kelompok dosis tinggi, jaringan yang sama harus diperiksa dari semua hewan dalam semua kelompok dosis lainnya.
- e. Dalam kasus organ berpasangan misalnya ginjal, adrenal, kedua organ harus diperiksa.

4.j. Analisis Data

Data yang dilaporkan adalah keadaan hewan secara individual dan dirangkum dalam bentuk tabel yang memperlihatkan data setiap kelompok uji. Data menunjukkan jumlah hewan pada awal pengujian; jumlah hewan yang mati selama pengujian atau dibunuh karena sekarat (*moribound*) serta waktu dicantumkan waktu kematian; jumlah hewan yang menunjukkan gejala toksisitas; deskripsi gejala toksisitas yang diamati, waktu dan lama terjadinya serta keparahan gejala toksisitas; tipe lesi dan persentase tiap lesi. Data yang berupa angka dievaluasi dengan metode statistik yang tepat dengan mencantumkan nilai rata-rata dan standar deviasi (untuk data kontinyu) terhadap jumlah hewan yang menunjukkan efek toksik atau terjadi lesi, selanjutnya dilakukan pengelompokan lesi berdasarkan tingkatannya.

4.k. Evaluasi Hasil

Kontrol data historis dapat berharga dalam interpretasi hasil uji, misalnya pada kasus ketika terdapat data pencilan pada kelompok kontrol jika dibandingkan data dari hewan kontrol lain pada pengujian di fasilitas/ laboratorium yang sama. Jika kontrol data historis akan dievaluasi, maka data

harus berasal dari fasilitas/laboratorium yang sama dan relevan untuk jenis hewan dan umur yang sama – data historis harus diperoleh dalam kurun 5 (lima) tahun sebelum uji dilakukan.

Jika memungkinkan, hasil numerik harus dievaluasi dengan tepat dan menggunakan metode statistik yang dapat diterima. Metode statistik dan data yang akan dianalisis harus ditentukan saat mendesain uji (sebelum uji dimulai).

4.1. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian harus berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Tinjauan Pustaka
3. Metodologi yang meliputi:
 - a. Sediaan uji:
 - keadaan fisik, sifat fisika kimia;
 - identifikasi dan kemurnian bahan.
 - b. Bahan pembawa :
 - alasan pemilihan pembawa (bila digunakan selain air).
 - c. Hewan uji :
 - jenis dan galur;
 - jumlah dan umur hewan uji;
 - sumber dan kondisi kandang;
 - berat individual hewan saat uji dimulai.
 - d. Kondisi pengujian
 - Pemilihan tingkatan dosis yang rasional;
 - Detil formulasi sediaan uji; konsentrasi, stabilitas dan homogenitas sediaan uji;
 - Cara pemberian sediaan uji;
 - Kondisi kandang dan ruangan pengujian;
 - Kualitas makanan dan minuman/diet.
4. Hasil pengujian
 - a. Umum
 - Data survival;
 - Berat badan/perubahan berat badan;
 - Konsumsi makanan, perhitungan efisiensi makanan, jika ada, dan konsumsi minuman, jika ada;

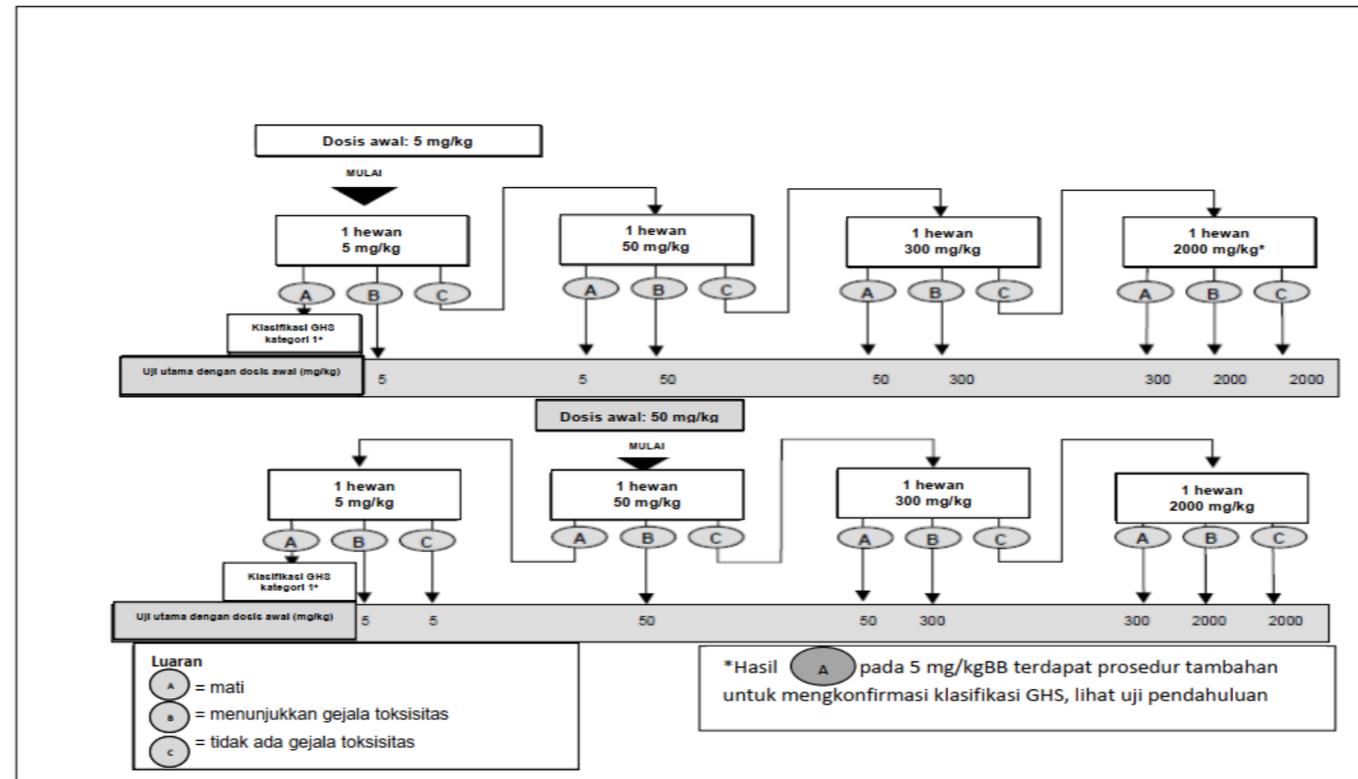
- Data toksikokinetik, jika ada;
 - Oftalmoskopi, jika ada;
 - Hematologi, jika ada;
 - Biokimia klinik, jika ada.
- b. Temuan Klinis:
- Gejala toksisitas;
 - Kejadian ketidaknormalan (jika dilakukan skoring ditetapkan keparahan);
 - Sifat, keparahan dan durasi pengamatan klinik (baik sementara atau menetap).
- c. Data Nekropsi:
- Berat badan akhir;
 - Berat organ dan rasionya, jika ada;
 - Temuan nekropsi, kejadian dan keparahan ketidaknormalan.
- d. Histopatologi:
- Temuan histopatologi non neoplastic;
 - Temuan histopatologi neoplastik
 - Korelasi antara temuan *gross necroscopy* dan mikroskopik;
 - Deskripsi rinci dari semua temuan histopatologi terkait sediaan uji termasuk tingkat keparahan;
 - Korelasi antara temuan *gross necroscopy* dan mikroskopik;
 - Laporan *peer review* dari slide.
5. Analisis statistik yang sesuai
6. Diskusi dari hasil yang meliputi:
- Diskusi tentang setiap pendekatan pemodelan:
- a. Hubungan dosis-respon;
 - b. Data kontrol historis;
 - c. Pertimbangan mekanisme aksi toksisitas;
 - d. Penentuan BMD, NOAEL atau LOAEL;
 - e. Relevansi pada manusia.

BAB IV

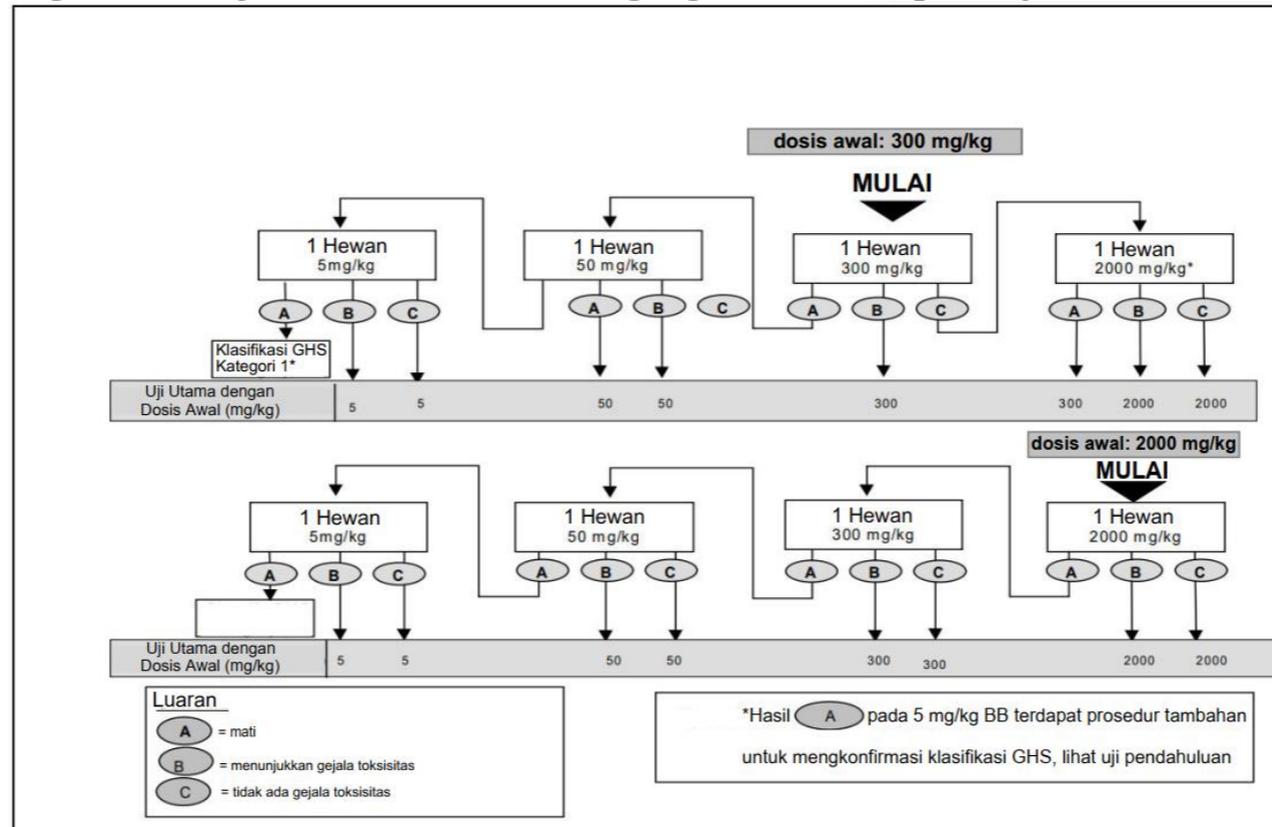
PENJELASAN TEKNIS UJI TOKSISITAS PRAKLINIK SECARA IN VIVO

Bab ini memberikan informasi mengenai beberapa penjelasan teknis prosedur uji yang tercantum dalam pelaksanaan uji toksisitas praklinik secara *in vivo* pada Bab III. Penjelasan teknis diharapkan dapat memberikan gambaran untuk memudahkan pelaksanaan uji. Pelaku usaha atau lembaga penelitian/riset dapat menggunakan metode lain yang valid dan sah, misalnya pada penetapan kadar pemeriksaan parameter biokimia klinis dapat disesuaikan dengan alat dan bahan yang digunakan sesuai dengan petunjuk pada *Manufacturing Procedure*.

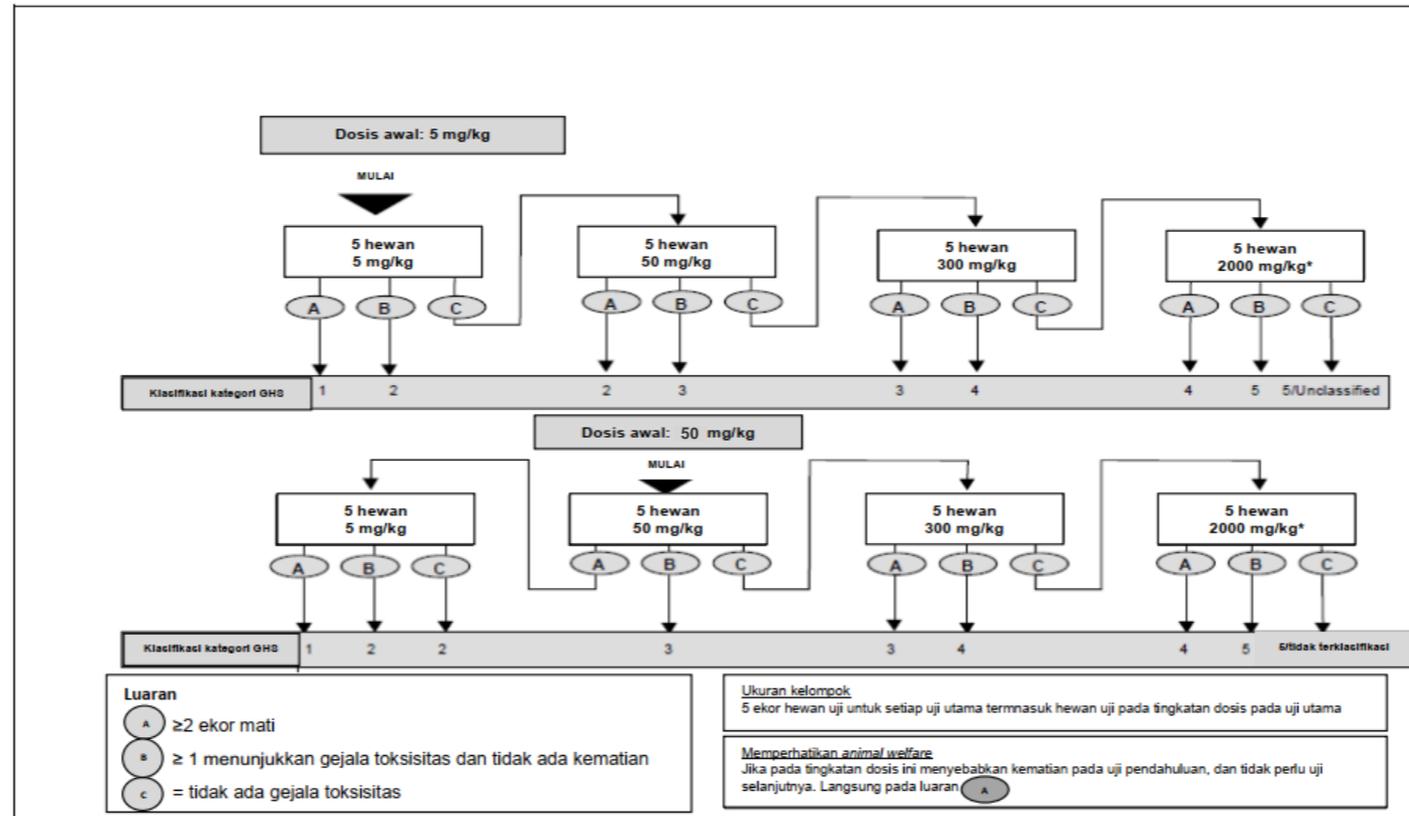
A. Bagan uji pendahuluan dengan *starting dose* 5 dan 50 mg/kg berat badan pada uji *Fixed Dose Procedure Method* (OECD, 2001)



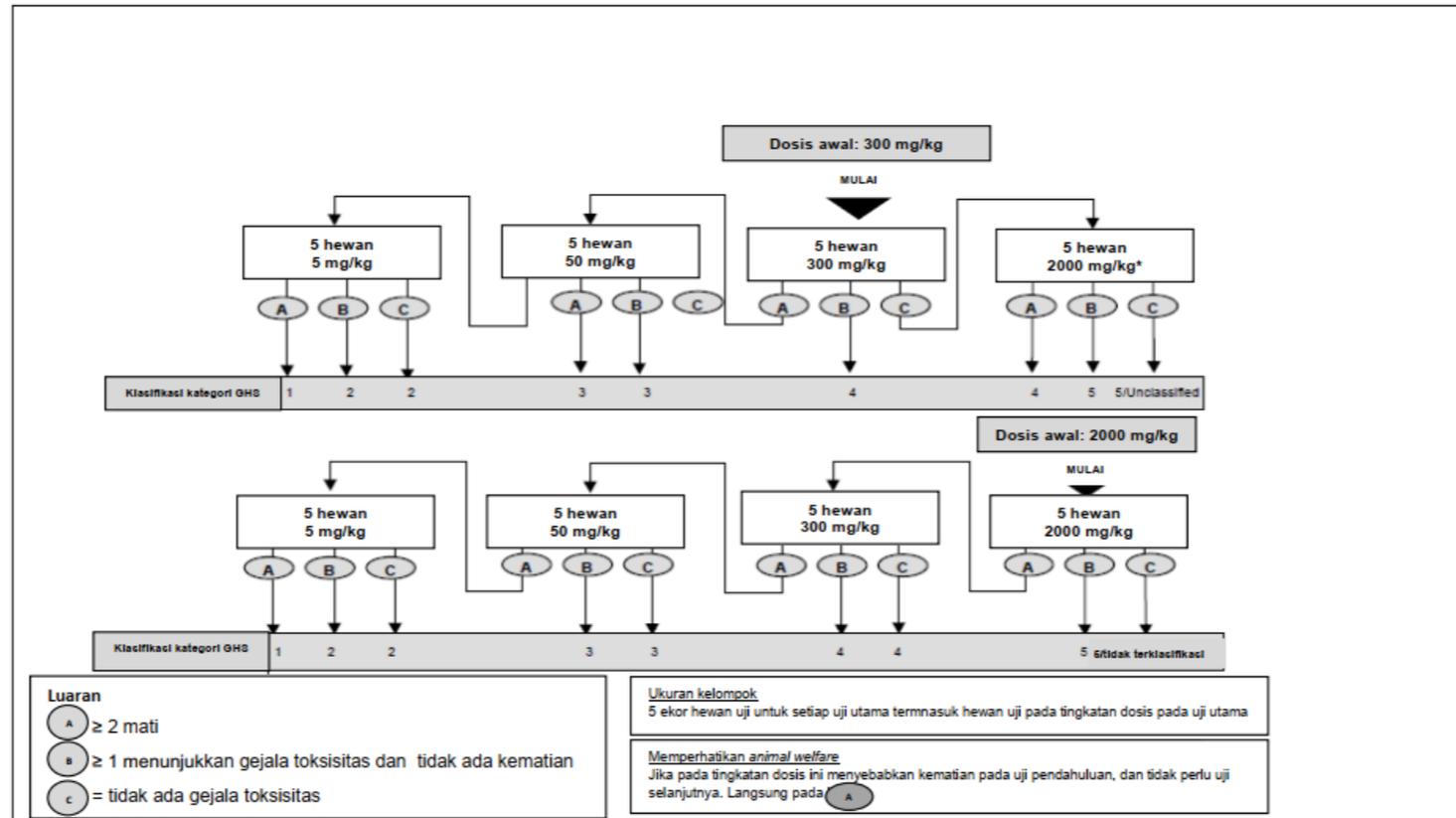
B. Bagan uji pendahuluan dengan *starting dose* 300 dan 2000 mg/kg berat badan pada uji *Fixed Dose Procedure Method* (OECD, 2001)



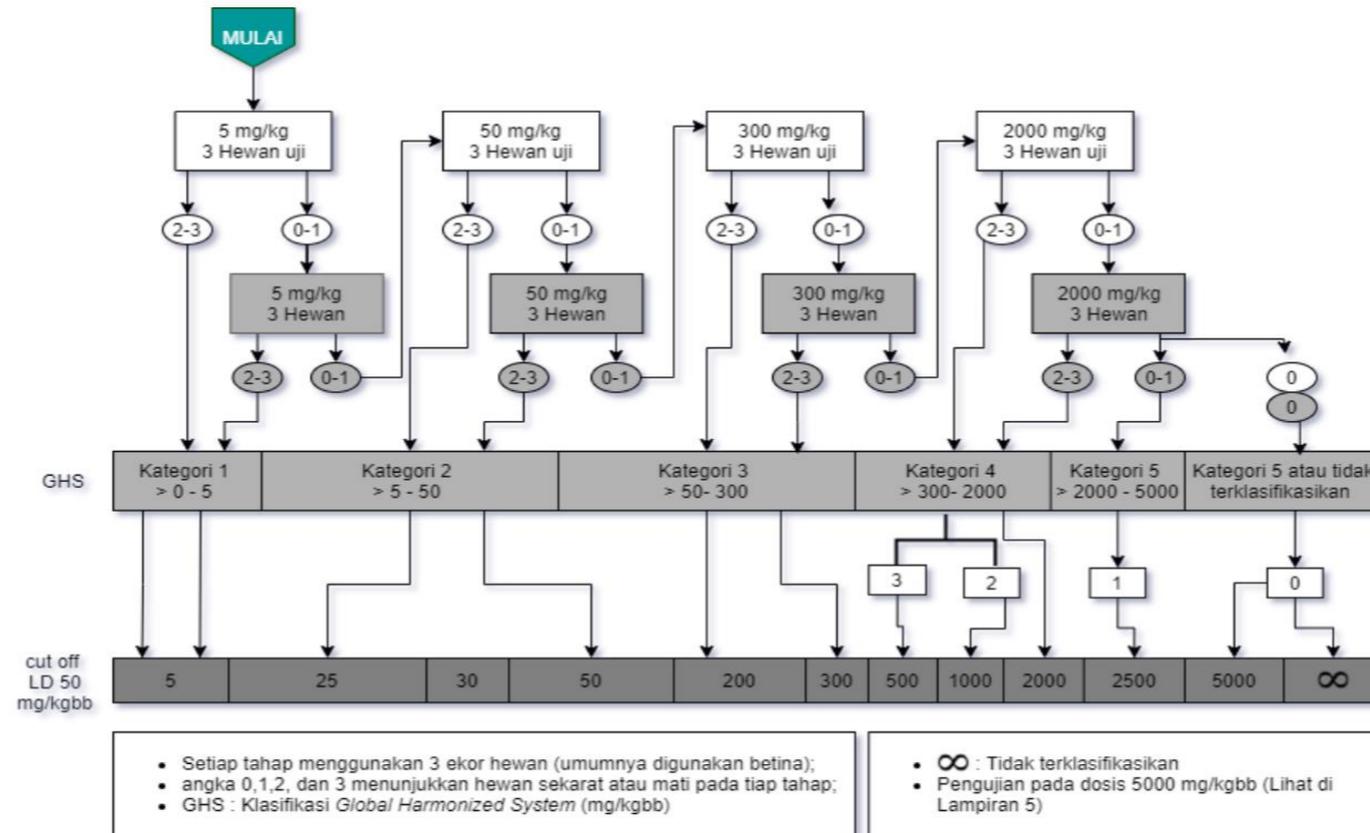
C. Bagan uji utama dengan *starting dose* 5 dan 50 mg/kg berat badan pada uji *Fixed Dose Procedure Method* (OECD, 2001)



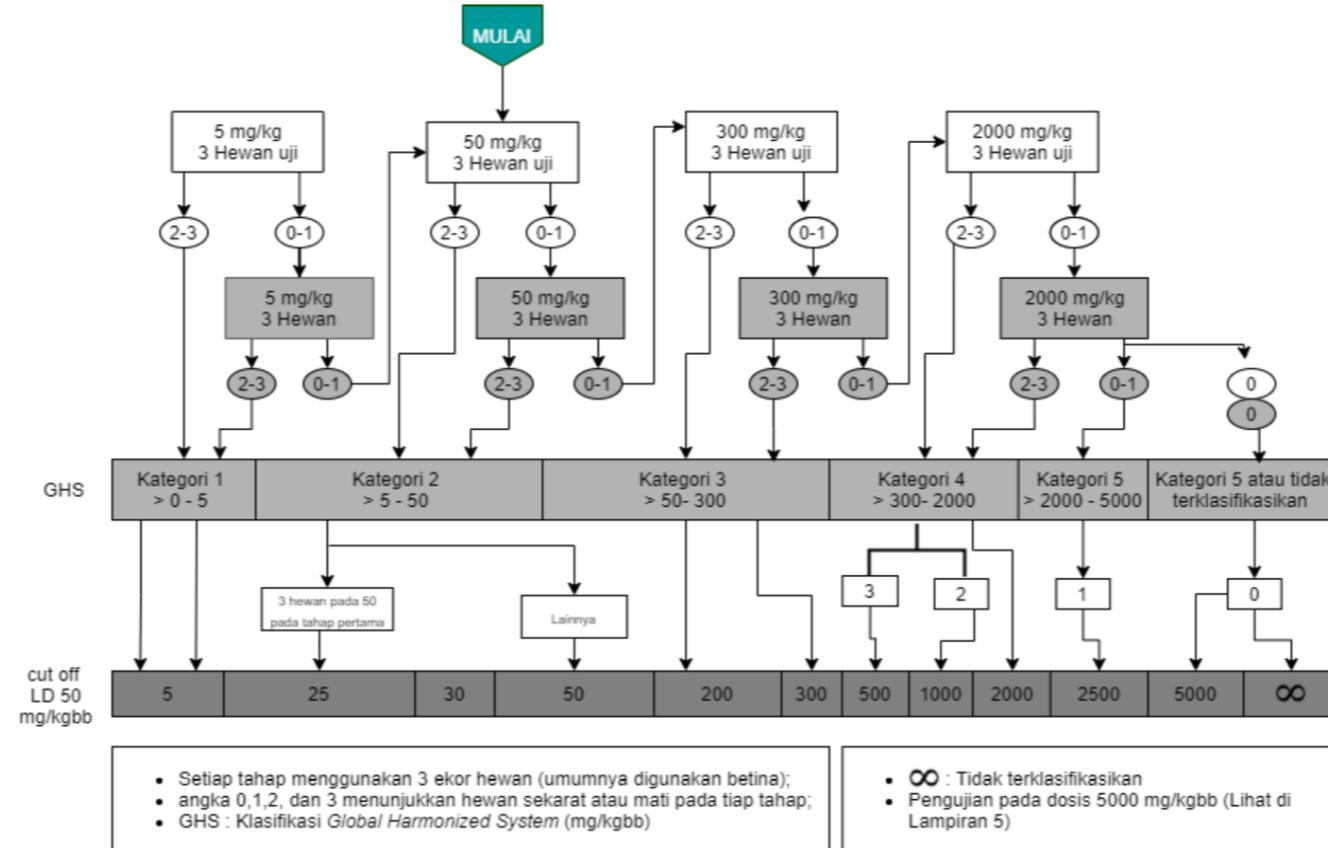
D. Bagan uji utama dengan *starting dose* 300 dan 2000 mg/kg berat badan pada uji *Fixed Dose Procedure Method* (OECD, 2001)



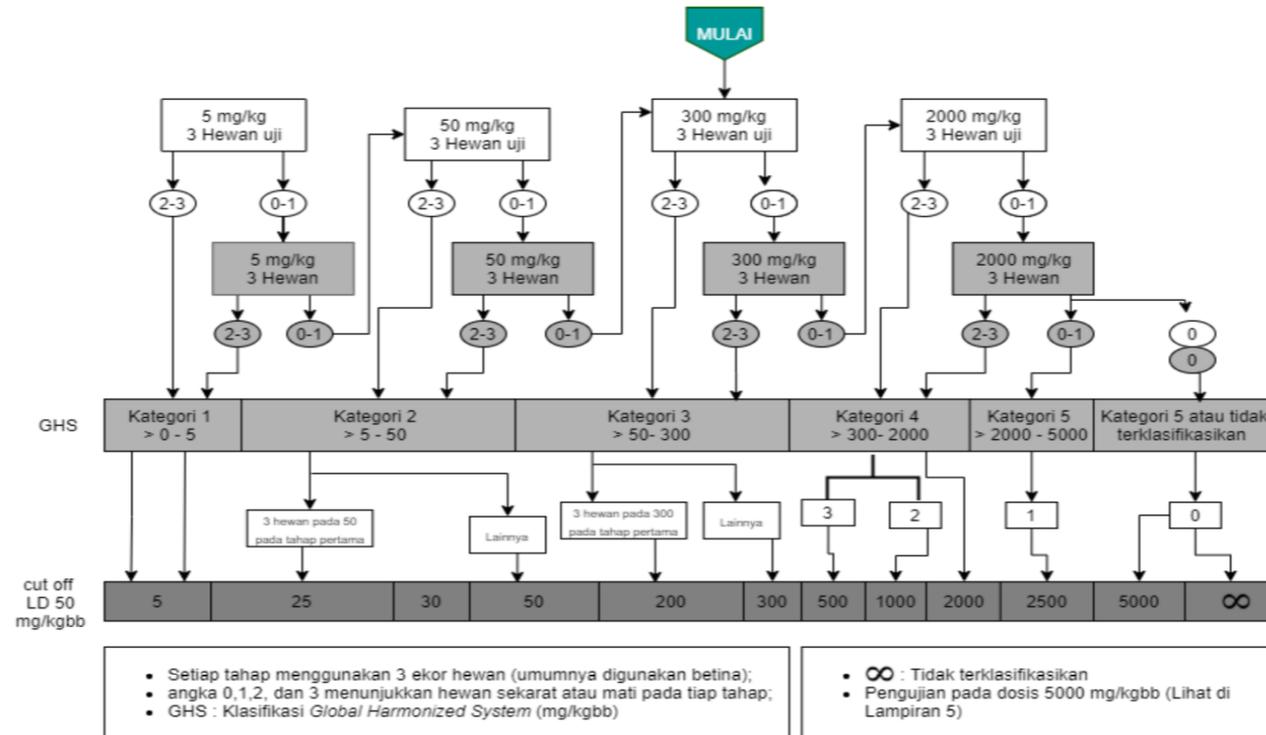
E. Bagan uji dengan *starting dose* 5 mg/kg berat badan pada uji *Acute Toxic Class Method* (OECD, 2001)



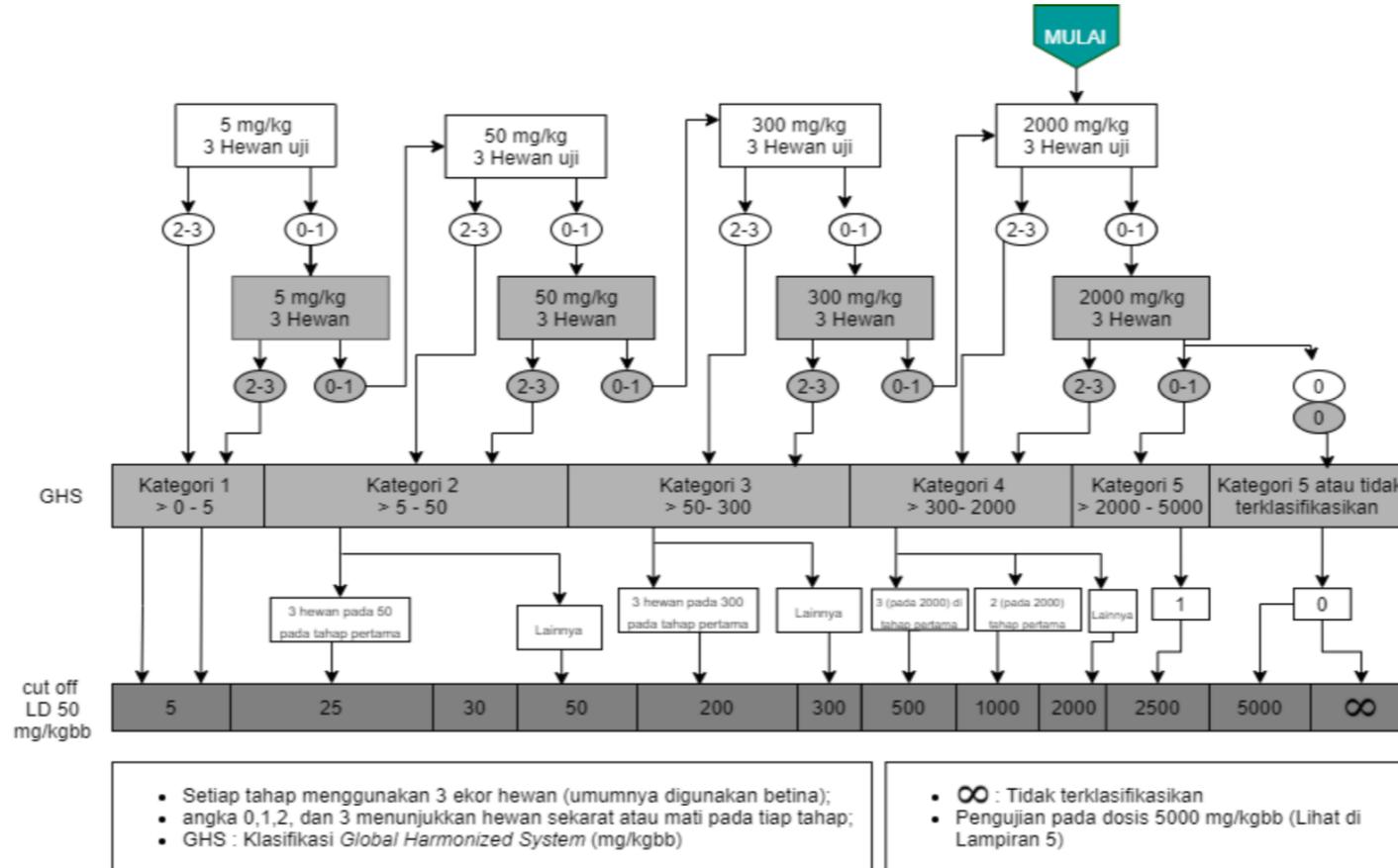
F. Bagan uji dengan *starting dose* 50 mg/kg berat badan pada uji *Acute Toxic Class Method* (OECD, 2001)



G. Bagan uji dengan starting dose 300 mg/kg berat badan pada uji Acute Toxic Class Method (OECD, 2001)



H. Bagan uji dengan *starting dose* 2000 mg/kg berat badan pada uji *Acute Toxic Class Method* (OECD, 2001)



I. Progresi Dosis pada uji *Up and Down Procedure*.

Dipilih slope dan dibaca kolom ke bawah (semua dosis dalam mg/kg berat badan)

Slope =	1	2	3	4	5	6	7	8
	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*
					0.275	0.26	0.24	0.23
				0.31		0.34	0.31	
			0.375			0.375		
					0.44	0.47	0.41	
	0.55		0.55		0.55	0.55	0.55	
				0.69		0.65	0.73	
			0.81			0.82		
				0.99		0.91	0.97	
				1.09	1.2	1.26	1.29	
	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	
					2.75	2.6	2.4	2.3
				3.1		3.4	3.1	
			3.75			3.75		
				4.4			4.1	
						4.7		
	5.5		5.5		5.5	5.5	5.5	
				6.9		6.5	7.3	
			8.1			8.2		
				9.9		9.1	9.7	
				10.9	12	12.6	12.9	
	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	
						24	23	
				27.5	26			
						34	31	
				31				

Table 1 continued

Slope =	1	2	3	4	5	6	7	8
			37.5			37.5		
					44			41
		55		55		55	47	55
							65	
					69			73
			81			82	91	97
				99		109	120	
							126	129
	175	175	175	175	175	175	175	175
							240	230
					275	260		
				310			340	310
			375			375		
					440			410
							470	
		550		550		550	650	550
					690			730
			810			820	910	970
				990		1090	1200	
							1260	1290
	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750
							2400	2300
					2750	2600		
				3100				3100
						3750	3400	
								4100
	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000

* If lower doses are needed, continue progressions to a lower dose

J. Pemeriksaan Hematologi

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan parameter hematologi antara lain konsentrasi hemoglobin (Hb), jumlah eritrosit (RBC), jumlah leukosit (WBC), hitung jenis leukosit, hematokrit (Ht) dan jumlah platelet (trombosit) dan perhitungan tetapan darah yaitu: MCV, MCH, MCHC atau sesuai dengan jenis yang dibutuhkan.

Prinsip

Melakukan pengujian parameter hematologi yang dibutuhkan dengan menggunakan metode yang valid misalnya menggunakan alat Hematoanalyzer.

Bahan

Darah

Antikoagulan

Larutan Isotonis

Larutan Lisis Eritrosit

Larutan Cleanac

Bahan lain yang dibutuhkan sesuai dengan spesifikasi alat yang digunakan.

Alat

Alat yang dibutuhkan antara lain:

Mesin sentrifugasi

Tabung mikrosentrifus

Pipet otomatis

Yellow tip

Hematoanalyzer

Prosedur

Prosedur umum yang dilakukan adalah sebagai berikut, namun dapat disesuaikan dengan petunjuk pada *manufacturer procedure*.

Darah diambil dari vena jugularis sebanyak 0,5 cc dan ditambahkan antikoagulan EDTA-2K (*Ethylendiamine Tetra-Acetic Acid, 2K salt*) 5 % sebanyak 10 μ L. Selanjutnya darah diperiksa menggunakan alat Hematoanalyzer sesuai dengan kebutuhan data yang diperlukan.

K. Pembuatan dan pewarnaan apusan darah untuk penetapan diferensial leukosit

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk membuat dan mewarnai apusan serta menghitung diferensial leukosit.

Prinsip

Apusan darah pada kaca obyek yang diwarnai dengan pewarna *Wright-Giemsa* akan memberikan warna pada granula dan inti. Berbagai jenis leukosit darah perifer diamati dibawah mikroskop, dan ditentukan persentase distribusinya.

Bahan

Larutan pewarna *Wright*

Larutan pewarna *Giemsa* 3%

Larutan dapar fosfat pH 6,4; konsentrasi 1/15 M

Aquades

Metanol

Alat

Hematospiner

Kaca obyek dan kaca penutup 0,4 mm

Nampan untuk kaca obyek

Bejana kaca untuk pewarnaan

Rak yang sesuai

Peralatan gelas

Mikroskop binokuler

Alat hitung leukosit

Penyiapan sediaan

a. Larutan dapar fosfat 1/150 M

Satu bungkus (10 g) serbuk dapar fosfat pH 6,4 konsentrasi 1/15 M dimasukkan kedalam gelas ukur bertutup, kemudian dilarutkan dengan aquades sampai 1000 mL. Sejumlah 25 mL larutan dipindahkan ke dalam gelas ukur bertutup, kemudian diencerkan dengan aquades sampai 250 mL.

b. Larutan *Giemsa* 3%

Sejumlah 3 mL larutan pewarna *Giemsa* dimasukkan ke dalam gelas ukur bertutup, kemudian diencerkan dengan larutan dapar fosfat pH 6,4 konsentrasi 1/15 M sampai tanda 100 mL.

Prosedur

a. Pembuatan apusan darah

Darah yang diambil dari vena jugularis kurang lebih 0,5 cc dituangkan ke dalam kaca obyek melalui pinggir sehingga darah menyebar merata kepermukaan kaca obyek. Selanjutnya kaca obyek diletakkan pada alat Hematospiner dan ditekan sampai seluruh darah dipermukaan kaca obyek kering merata.

b. Pewarnaan apusan darah

Apusan yang telah kering segera difiksasi di dalam metanol selama 2 menit, selanjutnya disusun di dalam rak untuk pewarnaan. Urutan pewarnaan sebagai berikut: dimasukkan dalam larutan pewarna *Wright* selama 3 menit, dicelupkan dalam larutan dapar fosfat 1/15 M (I) selama 10 kali pencelupan, dicelupkan dalam larutan dapar fosfat 1/15 M (II) selama 10 kali pencelupan, dimasukkan dalam larutan *Giemsa* 3% selama 20 menit dan kemudian ke dalam air selama 2 menit. Masing-masing kaca obyek dikeluarkan dari rak, kemudian diletakkan diatas kertas penyerap sampai kering. Pewarnaan dinilai baik jika warnanya merah jambu.

c. Apusan darah yang sudah diwarnai segera diperiksa diferensial leukositnya menggunakan mikroskop binokuler dan alat hitung leukosit. Jenis sel leukosit yang terdiri dari limfosit, monosit, neutrofil, eosinofil dan basofil dihitung jumlahnya untuk kemudian ditentukan persentasenya.

L. Penetapan kadar protein total

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar protein total dalam serum dan urin.

Prinsip

Penetapan kadar protein total dilakukan dengan metode *colorimetric test biuret*. Protein yang direaksikan dengan ion kupri dalam suasana basa akan membentuk garam kompleks protein berwarna ungu kebiruan dan absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit.

Bahan

Serum uji

Pereaksi uji terdiri dari campuran 4 bagian pereaksi A dan 1 bagian pereaksi B

Pereaksi A: 80 mM natrium hidroksida dan 12.8 mM kalium natrium

tartrat

Pereaksi B: 100 mM natrium hidroksida, 16 mM kalium natrium tartrat,
15 mM kalium yodida, 6 mM tembaga sulfat
Standar total protein 5 g/dL

Alat

Spektrofotometer
Penangas air
Vortex
Tabung reaksi ukuran 5 mL
Pipet Eppendorf 20 µL, 1000 µL
Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 20 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan kadar protein total dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex, diinkubasi pada suhu 37^o C selama 5 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Dilakukan hal yang sama terhadap blangko (pereaksi + aquades) dan standar (pereaksi + standar total protein). Kadar protein-total dapat dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan absorbansi protein standar yang dikalikan dengan konsentrasi protein standar. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\text{Total protein (g/dL)} = \frac{A \text{ Sampel} - A \text{ blangko}}{A \text{ Standar} - A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi standar (g/dL)}$$

M. Penetapan kadar albumin

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar albumin dalam serum

Prinsip

Penetapan kadar albumin dilakukan dengan metode *Colorimetric test bromcresol green method*. Albumin yang direaksikan dengan hijau bromkresol akan membentuk warna hijau kekuning-kuningan dan absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit.

Bahan

Serum uji
Pereaksi untuk pemeriksaan albumin terdiri dari :

- 30 mM bufer sitrat pH 4,2
- 0,26 mM hijau bromkresol

Standar albumin 5 g/dL

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 20 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 10 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan albumin dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex, inkubasi pada suhu 37^o C selama 5 menit. Absorbansi diukur dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm. Dilakukan hal yang sama terhadap blangko (pereaksi + aquades) dan standar (pereaksi + standar albumin). Kadar albumin dapat dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan absorbansi albumin standar yang dikalikan dengan konsentrasi albumin standar. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\text{Albumin (g/dL)} = \frac{A \text{ Sampel} - A \text{ blangko}}{A \text{ Standar} - A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi standar (g/dL)}$$

N. Penetapan kadar nitrogen urea

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar nitrogen urea dalam serum

Prinsip

Penetapan kadar nitrogen urea dilakukan dengan metode *Enzymatic UV test, Urease - GLDH*. Nitrogen urea dioksidasi menggunakan enzim urease dan enzim GLDH, perubahan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm pada suhu 37°C. Absorbansi tepat pada detik ke-30 dicatat sebagai (A1), kemudian absorbansi pada detik ke-90 dicatat sebagai (A2).

Bahan

Serum uji

Pereaksi uji terdiri dari campuran 4 bagian pereaksi A dan 1 bagian pereaksi B

Pereaksi A:

- 120 mM TRIS pH 7,8
- 7 mM 2-oksoglutarat
- 0,6 mM ADP
- ≥ 6 KU/I urease
- ≥ 1 KU/I GLDH

Pereaksi B:

- 0,25 mM NADH

Standar nitrogen urea 50 mg/dL

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 10 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan nitrogen urea dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37^o C tepat pada detik ke-30 pada panjang gelombang 340 nm sebagai (A1), kemudian absorbansi diukur lagi tepat pada detik ke-60 sebagai (A2). Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades) dan standar (pereaksi + standar nitrogen urea). Kadar nitrogen urea dapat dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan absorbansi nitrogen urea standar yang dikalikan dengan konsentrasi nitrogen urea standar. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\Delta A \text{ sampel} = (A2 - A1)$$

$$\Delta A \text{ blangko} = (A2 - A1)$$

$\text{Nitrogen urea (mg/dL)} = \frac{\Delta A \text{ Sampel} - \Delta A \text{ blangko}}{\Delta A \text{ Standar} - \Delta A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi standar (mg/dL)}$

O. Penetapan kadar kreatinin

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar kreatinin dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar kreatinin dilakukan dengan metode *kinetic test without deproteinisation Jaffe*. Kreatinin yang direaksikan dengan pikrat alkali akan membentuk warna merah orange diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 492 nm, suhu 37°C. Absorbansi dicatat tepat pada detik ke-60 sebagai (A1), kemudian tepat pada detik ke-180 sebagai (A2).

Bahan

Serum uji

Pereaksi uji terdiri dari campuran 4 bagian pereaksi A dan 1 bagian pereaksi B

Pereaksi A: 0,16 M natrium hidroksida

Pereaksi B: 4,0 mM asam pikrat

Standar kreatinin 2 mg/dL

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 100 µL, 1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 50 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan kreatinin dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37^o C tepat setelah 60 detik pada panjang gelombang 492 nm (A1), diukur lagi absorbansi tepat setelah 120 detik (A2). Hal yang sama dilakukan terhadap blanko (pereaksi + aquades) dan standar (pereaksi + standar kreatinin). Kadar kreatinin dapat dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan absorbansi kreatinin standar yang dikalikan dengan konsentrasi kreatinin standar. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\Delta A \text{ sampel} = (A2 - A1)$$

$$\Delta A \text{ blanko} = (A2 - A1)$$

$\text{Kreatinin (mg/dL)} = \frac{\Delta A \text{ Sampel} - \Delta A \text{ blanko}}{\Delta A \text{ Standar} - \Delta A \text{ blanko}} \times \text{konsentrasi standar (mg/dL)}$

P. Penetapan kadar bilirubin total

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar bilirubin total dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar bilirubin total dilakukan dengan metode *colorimetric test DCA 2,4 dichloroaniline*. Bilirubin yang direaksikan dengan *diazotized dichloroaniline* akan membentuk warna merah yang diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit.

Bahan

Serum uji

Pereaksi uji terdiri dari pereaksi A dan pereaksi B

Pereaksi A:

- 8 mM TRIS pH 8,2
- 7 g/L NaCl
- deterjen

Pereaksi B:

- 1 mM garam 2,4-diklorofenil diazonium
- 30 mM HCl
- deterjen

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 100 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 25 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi A dalam tabung reaksi 5 mL, diinkubasi pada suhu 37^o C selama 5 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm (A1), kemudian tambahkan pereaksi B sejumlah 250 μ L dan dihomogenkan dengan bantuan vortex, selanjutnya absorbansi (A2) diukur lagi. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades) dan standar (pereaksi + standar bilirubin). Kadar bilirubin dapat dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan absorbansi bilirubin standar yang dikalikan dengan

konsentrasi bilirubin standar. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\Delta A \text{ sampel} = (A_2 - A_1)$$

$$\Delta A \text{ blangko} = (A_2 - A_1)$$

$$\text{Bilirubin total (mg/dL)} = \frac{\Delta A \text{ Sampel} - \Delta A \text{ blangko}}{\Delta A \text{ Standar} - \Delta A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi standar (mg/dL)}$$

Q. Penetapan kadar glukosa

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar glukosa dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar glukosa dilakukan dengan metode *enzymatic colorimetric test*, *GOD - PAP*. Glukosa yang dioksidasi dengan enzim glukosa oksidase akan membentuk warna merah yang diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit.

Bahan

Serum uji

Pereaksi untuk pemeriksaan glukosa terdiri dari :

- 250 mM bufer fosfat pH 7,5
- 5 mM fenol
- 0,5 mM 4-aminioantipirin
- \geq 15 KU/I glukosa oksidase
- \geq 1 KU/I peroksidase

Standar glukosa 100 mg/dL

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 20 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 10 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan glukosa dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex, diinkubasi pada suhu 37^o C selama 5 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades) dan standar (pereaksi + standar glukosa). Kadar glukosa dapat dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan absorbansi glukosa standar yang dikalikan dengan konsentrasi glukosa standar. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$GLukosa (g/dL) = \frac{A \text{ Sampel} - A \text{ blangko}}{A \text{ Standar} - A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi standar (g/dL)}$$

R. Penetapan kadar kolesterol total

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar kolesterol total dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar kolesterol dilakukan dengan metode *colorimetric enzymatic test*, *CHOD-PAP*. Kolesterol yang dihidrolisa dan dioksidasi ditambah dengan indikator akan terbentuk warna merah yang diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm, setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit.

Bahan

Serum uji

Pereaksi untuk pemeriksaan kolesterol terdiri dari:

- 50 mM *Good's buffer* (bufer fosfat) pH 6,7
- 5 mM fenol
- 0,3 mM 4-aminioantipirin
- \geq 200 U/I kolesterol esterase
- \geq 50 U/I kolesterol oksidase
- \geq 3 KU/I peroksidase

Standar kolesterol 200 mg/dL

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL
Pipet Eppendorf 20 μ L, 1000 μ L
Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 10 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan kolesterol di dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex, diinkubasi pada suhu 37^o C selama 10 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades) dan standar (pereaksi + standar kolesterol). Kadar kolesterol dapat dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan absorbansi kolesterol standar yang dikalikan dengan konsentrasi kolesterol standar. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\text{Kolesterol total (g/dL)} = \frac{A \text{ Sampel} - A \text{ blangko}}{A \text{ Standar} - A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi standar (g/dL)}$$

S. Penetapan kadar trigliserida

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar trigliserida dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar trigliserida dilakukan dengan metode *colorimetric enzymatic test*, "GPO". Trigliserida direaksikan dengan lipoprotein lipase dengan bantuan indikator akan berwarna merah yang intensitas warnanya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm, setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit.

Bahan

Serum uji

Pereaksi untuk pemeriksaan trigliserida terdiri dari:

- 50 mmol/L *Good's buffer* (bufer fosfat) pH 7,2
- 4 mmol/L 4-chlorophenol
- 2 mmol/L ATP
- 15 mmol/L Mg²⁺
- \geq 0,4 KU/I glycerokinase
- \geq 2 KU/I peroxidase
- \geq 2 KU/I lipoprotein lipase
- 0,5 mmol/L 4-aminoantipyrine

- $\geq 0,5$ KU/I glycerol-3-phosphate-oxidase

Standar trigliserida 200 mg/dL

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 20 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 10 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan trigliserida di dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex, diinkubasi pada suhu 37^o C selama 10 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades) dan standar (pereaksi + standar trigliserida). Kadar trigliserida dapat dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan absorbansi trigliserida standar yang dikalikan dengan konsentrasi trigliserida standar. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\text{Trigliserida (g/dL)} = \frac{A \text{ Sampel} - A \text{ blangko}}{A \text{ Standar} - A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi standar (g/dL)}$$

T. Penetapan gamma-glutamyltransferase (γ -GT)

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar γ -GT dalam serum.

Prinsip

Penetapan gamma-glutamyltransferase γ -GT dilakukan dengan metode Szasz yaitu dengan *kinetic photometric test*. γ -GT mengkatalisis perubahan asam glutamat dan *glycylglycine* menjadi *gamma-glutamyl-glycylglycine* dan *5-amino-2-nitrobenzoate*, *5-amino-2-nitrobenzoate*. Senyawa yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 405 nm tepat pada menit ke-1 sebagai (A1), menit ke-2 sebagai (A2) dan menit ke-3 sebagai (A3). Kadar γ -GT dapat dihitung dengan menghitung rata-rata selisih absorbansi setiap menit dikali faktor Szasz (1158).

Bahan

Serum uji

Pereaksi uji terdiri dari campuran 4 bagian pereaksi A dan 1 bagian pereaksi B

Pereaksi A:

- 100 mM TRIS pH 8,25
- 100 mM *glycylglycine*

Pereaksi B:

- 4 mM *L-gamma-glutamyl-3-carboxy-4-nitroaniide*

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 100 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 100 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan γ -GT di dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37^o C tepat setelah menit ke 1, 2, dan 3 pada panjang gelombang 405 nm. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades). Kadar γ -GT dapat dihitung dengan menghitung rata-rata selisih absorbansi sampel permenit di kalikan faktor Szasz (1158). Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\Delta A \text{ sampel} = \frac{(A3 - A2) + (A2 - A1)}{2}$$

$$\Delta A \text{ blangko} = \frac{(A3 - A2) + (A2 - A1)}{2}$$

$\gamma - GT(U/L) = (\Delta A \text{ Sampel} - \Delta A \text{ blangko}) \times \text{faktor } 1158$
--

U. Penetapan kadar fosfatase alkali

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar fosfatase alkali dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar fosfatase alkali dilakukan dengan metode *kinetic colorimetric test*. Fosfatase alkali menghidrolisis p-nitrofenilfosfat (pereaksi B) menjadi fosfat dan p-nitrofenol. Jumlah hasil urai yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 405 nm tepat pada menit ke-1 sebagai (A1), menit ke-2 sebagai (A2) dan menit ke-3 sebagai (A3). Kadar fosfatase alkali ditentukan dengan menghitung rata-rata selisih absorbansi setiap menit dikali faktor DGKC (2757).

Bahan

Serum uji

Pereaksi uji terdiri dari campuran 4 bagian pereaksi A dan 1 bagian pereaksi B

Pereaksi A:

- 1.0 mM dietanolamin pH 9,8
- 0.5 mM magnesium klorida

Pereaksi B:

- 10 mMp-nitrofenilfosfat

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 20 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 20 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan fosfatase alkali dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37^o C tepat setelah menit ke 1, 2, dan 3 pada panjang gelombang 405 nm. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades). Kadar fosfatase alkali dapat dihitung dengan menghitung rata-rata selisih absorbansi sampel permenit dikalikan faktor DGKC (2757). Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\Delta A \text{ sampel} = \frac{(A3 - A2) + (A2 - A1)}{2}$$

$$\Delta A \text{ blangko} = \frac{(A3 - A2) + (A2 - A1)}{2}$$

$$\text{Fosfatase alkali (U/L)} = (\Delta A \text{ Sampel} - \Delta A \text{ blangko}) \times \text{faktor 2757}$$

V. Penetapan kadar GOT (*Glutamat Oksaloasetat Transaminase*).

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar GOT dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar GOT dilakukan dengan metode *optimized UV test*. L-aspartat (pereaksi A) dan 2-oksoglutarat (pereaksi B) dengan adanya GOT akan menjadi L-glutamat dan oksaloasetat, hasil urai tersebut dengan adanya NADH akan direduksi menghasilkan l-malat dan NAD⁺. Jumlah hasil urai yang terbentuk diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm pada suhu 37^o C tepat pada menit ke-1 sebagai (A1), menit ke-2 sebagai (A2) dan menit ke-3 sebagai (A3). Kadar GOT dapat ditentukan dengan menghitung rata-rata selisih absorbansi setiap menit dikali faktor 1745.

Bahan

Serum uji

Pereaksi uji terdiri dari campuran 4 bagian pereaksi A dan 1 bagian pereaksi B

Pereaksi A:

- 80 mM TRIS pH 7,8
- 240 mM lL-aspartat

- ≥ 600 U/I MDH
- ≥ 600 U/I LDH

Pereaksi B:

- 12 mM 2-oksaloglutarat
- 0.18 mM NADH

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 100 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 100 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan GOT di dalam tabung reaksi 5 mL dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37°C tepat setelah menit ke 1, 2, dan 3 pada panjang gelombang 340 nm. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades). Kadar GOT dapat ditentukan dengan menghitung rata-rata selisih absorbansi sampel permenit dikalikan faktor 1745. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\Delta A \text{ sampel} = \frac{(A_3 - A_2) + (A_2 - A_1)}{2}$$

$$\Delta A \text{ blangko} = \frac{(A_3 - A_2) + (A_2 - A_1)}{2}$$

$$GOT(U/I) = (\Delta A \text{ Sampel} - \Delta A \text{ blangko}) \times \text{faktor } 1745$$

W. Penetapan kadar GPT (Glutamat Piruvat Transaminase)

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar GPT dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar GPT dilakukan dengan metode *optimized UV test*. L-alanin (pereaksi A) dan 2-oksoglutarat (pereaksi B) dengan adanya GPT akan menjadi L-glutamat dan piruvat, hasil urai tersebut dengan adanya NADH akan direduksi menghasilkan l-laktat dan NAD⁺. Jumlah hasil urai yang terbentuk

diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm pada suhu 37°C tepat pada menit ke-1 sebagai (A1), menit ke-2 sebagai (A2) dan menit ke-3 sebagai (A3). Kadar GPT dapat ditentukan dengan menghitung rata-rata selisih absorbansi setiap menit dikali faktor 1745.

Bahan

Serum uji

Pereaksi uji terdiri dari campuran 4 bagian pereaksi A dan 1 bagian pereaksi B

Pereaksi A:

- 100 mM TRIS pH 7,15
- 500 mM L-alanin
- ≥ 1700 U/I LDH

Pereaksi B:

- 15 mM 2-oksaloasetat
- 0.18 mM NADH

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 100 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 100 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan GPT dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37^o C tepat setelah menit ke 1, 2, dan 3 pada panjang gelombang 340 nm. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades). Kadar GPT dapat ditentukan dengan menghitung rata-rata selisih absorbansi sampel permenit dikalikan faktor 1745. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\Delta A \text{ sampel} = \frac{(A3 - A2) + (A2 - A1)}{2}$$

$$\Delta A \text{ blangko} = \frac{(A3 - A2) + (A2 - A1)}{2}$$

$$\text{GPT (U/l)} = (\Delta A \text{ Sampel} - \Delta A \text{ blangko}) \times \text{faktor 1745}$$

X. Penetapan kadar LDH (Laktat Dehidrogenase)

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar LDH dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar LDH dilakukan dengan metode *Optimized UV Test*. Piruvat (pereaksi A) dan NADH (pereaksi B) dengan adanya LDH akan direduksi menjadi laktat dan NAD⁺. Hasil urai yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm pada suhu 37^o C tepat pada menit ke-1 sebagai (A1), menit ke-2 sebagai (A2) dan menit ke-3 sebagai (A3). Kadar LDH dapat ditentukan dengan menghitung rata-rata selisih absorbansi setiap menit dikali faktor 16030.

Bahan

Serum uji

Pereaksi uji terdiri dari campuran 4 bagian pereaksi A dan 1 bagian pereaksi B

Pereaksi A:

- 50 mM buffer fosfat pH 7, 5
- 0.6 mM piruvat

Pereaksi B:

- 0.18 mM NADH

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 20 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 10 μ L serum uji direaksikan dengan 1000 μ L pereaksi uji untuk pemeriksaan LDH dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37⁰ C tepat setelah menit ke 1, 2, dan 3 pada panjang gelombang 340 nm. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades). Kadar LDH dapat dihitung dengan menghitung rata-rata selisih absorbansi sampel permenit dikalikan faktor 16030. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\Delta A \text{ sampel} = \frac{(A3 - A2) + (A2 - A1)}{2}$$

$$\Delta A \text{ blangko} = \frac{(A3 - A2) + (A2 - A1)}{2}$$

$$\text{LDH (U/I)} = (\Delta A \text{ Sampel} - \Delta A \text{ blangko}) \times \text{faktor 16030}$$

Y. Penetapan kadar natrium

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar natrium dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar natrium dilakukan dengan *colorimetric method endpoint*. Natrium dan protein dalam serum diendapkan dengan magnesium uranil asetat selanjutnya disentrifus, kelebihan ion uranil dalam supernatan direaksikan dengan asam tioglikolat membentuk kompleks berwarna hijau yang diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm.

Bahan

Serum uji

Pereaksi uji terdiri:

Pereaksi A sebagai presipitan

- 19 mM uranil asetat
- 140 mM magnesium asetat dalam etanol

Pereaksi B sebagai pereaksi warna

- 550 mM amonium tioglikolat
- 550 mM amoniak

Standar natrium

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Sentrifus

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Tabung mikrosentrifus

Pipet Eppendorf 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

- Presipitasi

50 μ L sampel ditambah 3 mL pereaksi A kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 5 menit, divortex lagi dengan saksama tidak kurang dari 30 detik, didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya disentrifus selama 2 menit pada 12000 rpm. Diambil bagian supernatan yang jernih. Dilakukan hal yang sama terhadap blangko dan standar.

- Kolorimetri

Pipet 50 μ L supernatan ditambahkan 3 mL pereaksi B, dihomogenkan dan didiamkan tidak kurang dari 5 menit pada suhu kamar. Absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm sebelum 30 menit. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko dan standar. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\text{Natrium (mM/L)} = \frac{A \text{ Sampel} - A \text{ blangko}}{A \text{ Standar} - A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi standar (mM/L)}$$

Z. Penetapan kadar kalium

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar kalium dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar kalium dilakukan dengan *nephelometric method endpoint*. Ion kalium dalam medium protein bebas alkalin direaksikan dengan natrium tetra fenil boron menghasilkan suspensi koloidal. Kekeruhan yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi kalium dalam sampel dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 576 nm

Bahan

Serum uji

Pereaksi uji terdiri:

Presipitan : Pereaksi A

- 0,3 Mol/L asam trikloro asetat

Pereaksi kerja : Pereaksi B dan Pereaksi C (1 : 1)

- Pereaksi B : 0,2 mol/mL natrium tetra fenil boron
- Pereaksi C : 2 M natrium hidroksida

Standar kalium 6,0 mM

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Sentrifus

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Tabung mikrosentrifus

Pipet Eppendorf 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

- Presipitasi
100 μ L sampel ditambah 1 mL pereaksi A kemudian dihomogenkan dan selanjutnya disentrifus selama 2 menit pada 12000 rpm. Diambil bagian supernatan yang jernih. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko dan standar.
- Kolorimetri
Sejumlah 200 μ L supernatan dipipet ditambahkan dengan 2 mL pereaksi

kerja, supernatan ditambahkan pada bagian tengah pereaksi kerja agar menghasilkan kekeruhan yang homogen. Campuran tersebut didiamkan dalam tabung reaksi tidak kurang dari 5 menit pada suhu kamar ($\pm 30^{\circ}$ C). Absorbansi diukur pada panjang gelombang 576 nm tidak lebih dari 30 menit. Dilakukan hal yang sama terhadap blangko dan standar.

Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\text{Kalium (mM/L)} = \frac{A \text{ Sampel} - A \text{ blangko}}{A \text{ Standar} - A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi standar (mM/L)}$$

AA. Penetapan kadar asam empedu

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar asam empedu dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar asam empedu dilakukan dengan metode *colorimetric endpoint*. Pereaksi B (*3 α hidroksi bile acid*) direaksikan dengan NAD⁺ dengan bantuan enzim 3- α hidroksi steroid dehidrogenase (3 HSD) yang akan berubah menjadi asam empedu teroksidasi (3-keto steroid) dan NADH. Selanjutnya NADH yang terbentuk direaksikan dengan biru nitrotetrazolium (NBT) dengan bantuan enzim diaporase membentuk formazan yang berwarna biru keunguan. Warna yang terbentuk sebanding dengan kadar asam empedu dalam sampel, dan intensitas warnanya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm

Bahan

Serum uji

Pereaksi uji terdiri:

Pereaksi A:

- 50 U/L diaporase
- 1 mM NAD⁺
- 0,2 mmol NBT
- 0,2 mM asam oksamat
- 100 mM buffer fosfat, EDTA

Pereaksi B:

- 60 U/L 3- α HSD
- 50 mM buffer Tris

Standar asam empedu 35 μ M

Alat

Spektrofotometer

Vortex

Penangas air

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 80 μ L serum uji direaksikan dengan 600 μ L pereaksi A dalam tabung reaksi 5 mL dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37^o C selama 4 menit, Absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (A1), ditambahkan pereaksi B sejumlah 120 μ L di homogenkan dengan bantuan vortex dan diinkubasi selama 5 menit ,lalu absorbansinya diukur lagi. Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (pereaksi + aquades) dan standar (pereaksi + standar asam empedu). Kadar asam empedu dapat dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan absorbansi standar yang dikalikan dengan konsentrasi bilirubin standar. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\Delta A \text{ sampel} = (A2 - A1)$$

$$\Delta A \text{ blangko} = (A2 - A1)$$

$$\text{Asam empedu } (\mu\text{M/L}) = \frac{\Delta A \text{ Sampel} - \Delta A \text{ blangko}}{\Delta A \text{ Standar} - \Delta A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi standar } (\mu\text{M/L})$$

BB. Pedoman pembuatan preparat histopatologi

Ruang lingkup

Pada akhir percobaan uji toksisitas dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk melihat adanya kelainan pada organ yang ditimbulkan akibat pemberian sediaan uji. Prinsip dari pemeriksaan histopatologi adalah organ yang telah difiksasi dengan formalin, dicuci, didehidrasi, dibuat blok dengan parafin, kemudian dipotong menjadi sayatan tipis dan diberi pewarnaan selanjutnya diperiksa dengan mikroskop. Pemeriksaan histopatologi wajib dilakukan menggunakan metode skoring lesio.

Bahan

Larutan eosin alkohol 1%; larutan eosin alkohol 0,5%; larutan anilin biru-jingga G; larutan asam fosfotungstat; larutan asam periodat 0,5%; larutan

azokarmin G; larutan dapar formalin 10%; larutan hematoksilin Mayer; larutan kalium ferrosianida; larutan natrium bisulfat 3%; larutan Nuclear Fast Red; larutan Sudan III, larutan Eukit, etanol absolut, aquades, kertas tissue.

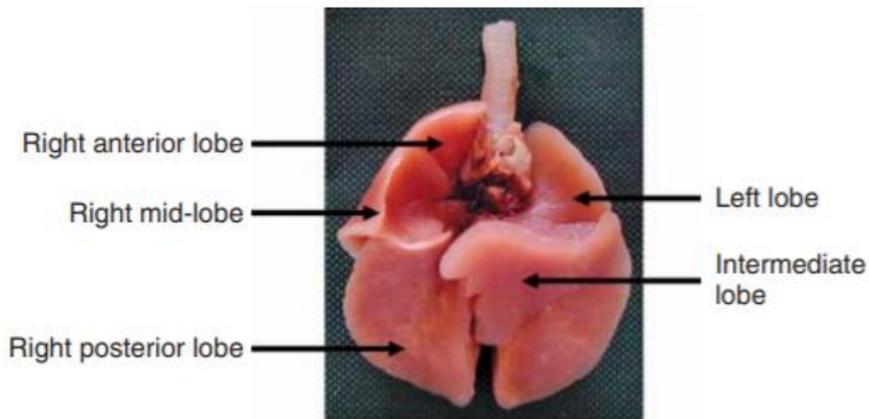
Alat

Pisau, kantong kasa, kain kasa, botol fiksasi, botol dehidrasi, alat dehidrasi otomatis, blok kayu, alat potong beku, mikrotom, kaca obyek, lemari pemanas, alat pewarna jaringan, mikroskop binokuler, obyek glas, cover glas.

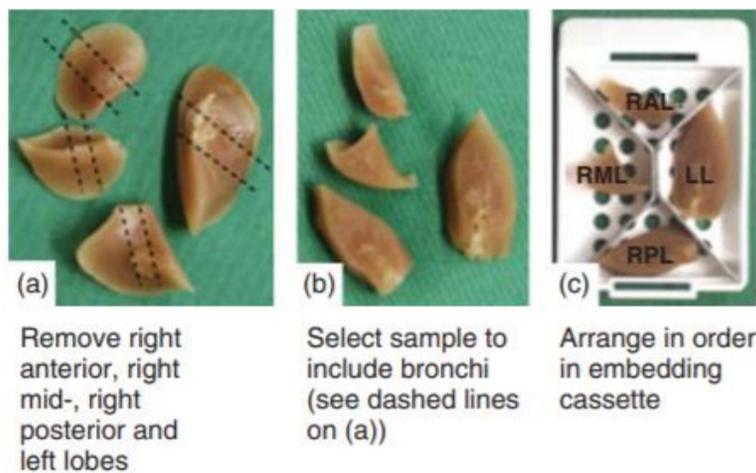
Prosedur

a. Pengambilan sampel

Sampel yang diambil sesegera mungkin setelah hewan dimatikan (dieuthanasia). Organ yang diperlukan diambil dan dipotong dengan ukuran 1 cm³. Organ-organ yang memiliki lobus (seperti paru-paru dan liver) dibagi berdasarkan lobusnya baru kemudian dipotong hingga mencapai ukuran 1 cm³. Organ dengan ukuran kurang dari 1 cm³ tidak perlu dipotong. Untuk organ yang mudah terjadi proteolisis (misalnya otak dan usus) perlu perlakuan khusus. Otak disayat transversal terutama di cerebrum terlebih dahulu sehingga mencapai ukuran 1 cm³ dan dicelupkan dalam formalin. Untuk usus dapat dibuka terlebih dahulu dan tidak boleh diusap. Apabila tidak bisa dibuka maka usus disuntikkan dengan formalin. Contoh pemotongan organ yang memiliki lobus yaitu paru-paru sesuai dengan gambar di bawah ini.



Guide for trimming and embedding lung lobes for histology



b. Fiksasi pertama

Semua organ yang telah dipotong direndam didalam larutan dapar formalin/ *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10% dengan volume minimal 10 kali lipat volume organ dan harus sering digoyang dan ditutup dengan baik. Kemudian organ tersebut dibiarkan selama 24-48 jam (fiksasi yang terlalu lama menyebabkan crosslinking antara protein di jaringan) pada suhu kamar (25° C). Satu botol digunakan untuk semua organ dari setiap hewan, masing-masing botol diberi nomor kode hewan dan tanggal diseksi.

Khusus untuk tulang setelah proses fiksasi dilakukan proses dekalsifikasi.

c. Dekalsifikasi

1. Cara langsung tanpa penghilangan lemak

Pada kantong yang berisi tulang dilakukan proses dekalsifikasi. Caranya dengan merendam tulang dalam larutan dekalsifikasi contohnya asam formiat 5%, setiap 24 jam diganti dengan larutan asam formiat 5% baru. Setelah kira-kira 3 x 24 jam tulang diperiksa kelunakannya dengan cara menusukkan benda runcing. Apabila tulang sudah lunak, maka proses dekalsifikasi dihentikan kemudian tulang dicuci dengan air mengalir selama 6 jam. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi.

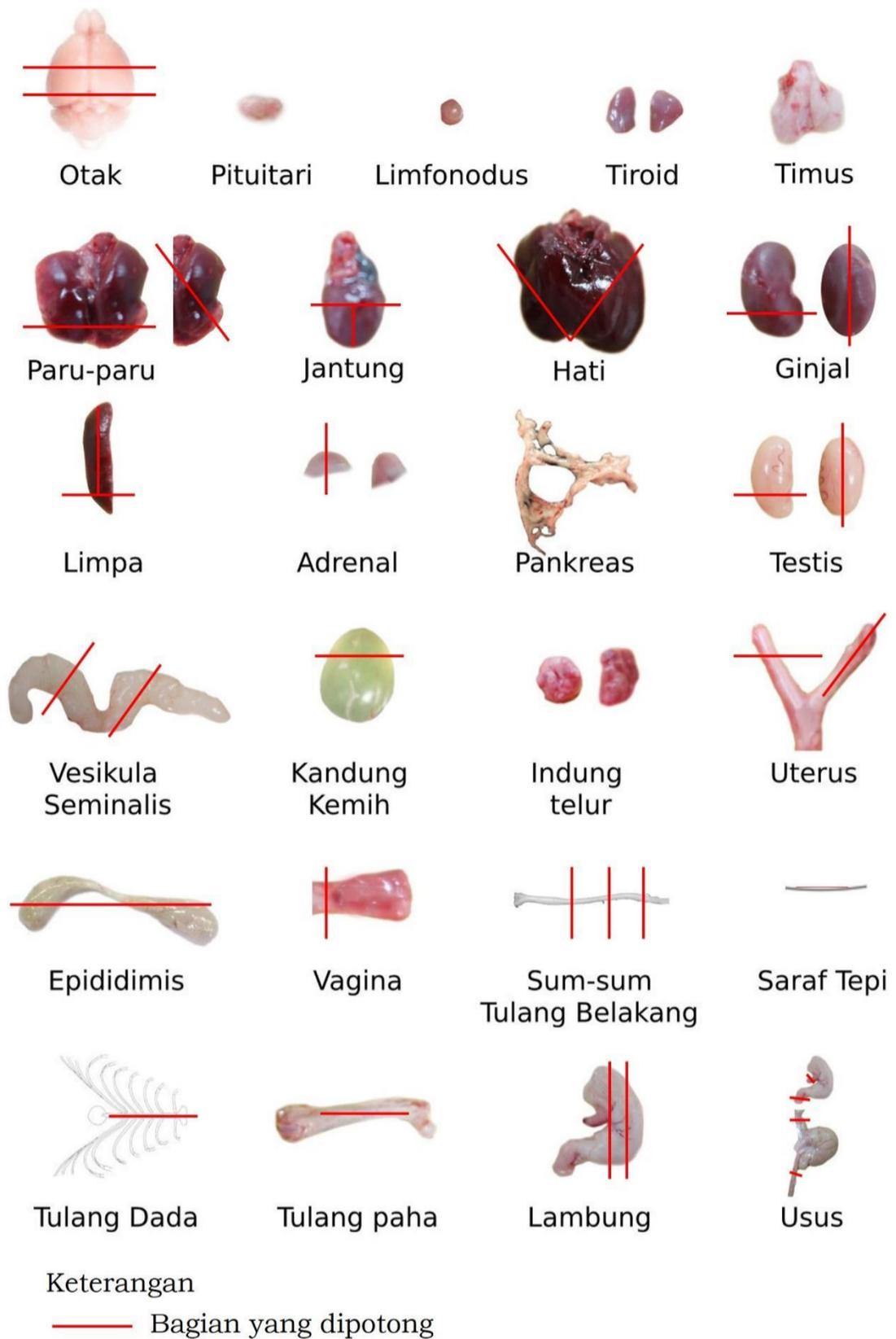
2. Cara tidak langsung dengan penghilangan lemak

Sebelum dilakukan proses perendaman dalam asam formiat 5%, tulang

direndam dalam etanol 70; 80; 90%; absolut; 90; 80; 70% masing-masing selama 2 jam.

d. Pemotongan kasar

Formalin dari masing-masing botol dibuang, lalu organ dipotong spesifik/trimming secara kasar seperti tertera pada Gambar 13. Kemudian potongan organ dari setiap hewan dimasukkan ke dalam satu kaset, tulang dimasukkan ke dalam kaset tersendiri, sedangkan sisa potongan dibungkus dengan kaset kantong kasa untuk arsip. Masing-masing kaset diberi tulisan nomor kode hewan. Pemotongan/ trimming tergantung dari keperluan. Untuk jantung dilihat ventrikel kiri sehingga dipotong melintang agar lumen dari ventrikel kanan dan kiri akan terlihat juga ketebalan dindingnya. Apabila organ jantung cukup besar maka dapat dipotong masing-masing ventrikel kiri dan kanan.



Gambar 13. Cara pemotongan organ (*trimming*)

(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

Contoh orientasi pemotongan untuk pemeriksaan histopatologi dapat dilihat pada Tabel 25 di bawah ini.

Tabel 25. Contoh orientasi pemotongan untuk pemeriksaan histopatologi (LS: *longitudinal section*, TS: *tranverse section*).

Block number	Tissues	Orientation/comments
1	Thymus, mesenteric lymph node, salivary glands	Thymus – representative LS sample Mesenteric lymph node – representative LS sample Salivary glands – LS to include all three major glands
2	Heart, skeletal muscle	Heart – LS section through all four chambers Muscle – TS of gastrocnemius
3	Liver, kidney, spleen	Liver – TS from left lateral and TS left and right medial lobes including gall bladder Kidney – TS from each organ or TS from left and LS from right (ensuring papilla included in both sections) Spleen – TS from largest part of organ
4	Lung	Lung – LS of four large lung lobes (remove accessory lobe) Inflate with fixative
5	Thyroid, parathyroid, aorta, oesophagus	Aorta – TS from thoracic aorta (brown fat often around aorta) Oesophagus – TS Thyroid, parathyroid – TS through thyroid and trachea Trachea – separate TS from below thyroid if needed
6	Adrenals	Adrenal glands – LS embed on any surface Ensure medulla is present
7	Brain	3 × TS sections Can include spinal cord
8	Ovaries or testes and epididymides	Ovary – if possible LS to include ovary, oviduct and tip of uterine horn Testes – TS from both or one TS and one LS Epididymides – LS from both
9	Urinary bladder, uterus and vagina or prostate and seminal vesicles	Urinary bladder – LS Uterus – TS both horns Vagina – LS through vagina, cervix and uterine body Seminal vesicle/coagulating gland – TS both sides Prostate – LS after careful positioning of dorsal and ventral lobes
10	Stomach, duodenum, jejunum, colon, pancreas	Stomach – LS sections through greater and lesser curvature including glandular and nonglandular Intestines – TS of each region Pancreas – LS left lobe
11	Ileum, caecum, rectum	Intestines – TS of each region
12	Skin, mammary	LS – from thoracic area to maximize chances of mammary tissue
13	Eyes (with optic nerve), Harderian gland	Eyes – orientate to include optic nerve Harderian gland and lens – LS and lens
14	Pituitary	Pituitary – LS
15	Sternum (includes bone marrow)	Sternum – LS to include marrow
16	Femur and stifle joint	Femur – LS to include stifle joint
17	Spinal cord	Spinal cord – following decalcification TS of cervical, thoracic and lumbar regions
18	Peripheral nerve (usually sciatic)	Nerve – LS
19	Brown and white fat	Brown fat – TS from dorsal shoulder fat pad White fat – LS perigenital fat pad

e. Fiksasi kedua

Kaset organ hasil potongan, sisa organ dan tulang dimasukkan ke dalam botol berisi larutan dapar formalin untuk difiksasi paling sedikit selama 1-3 hari.

f. Pencucian

Setelah fiksasi kedua, bila diperlukan untuk menghilangkan sisa formalin, kaset yang berisi organ dimasukkan ke dalam bak yang berisi air dan dialiri air ledeng secara terus menerus selama paling sedikit 6 jam.

g. Proses dehidrasi, pembeningan dan infiltrasi

Proses dehidrasi, pembeningan dan infiltrasi dilakukan menggunakan alat dehidrasi otomatis yaitu *tissue processor*. Cara kerja dehidrasi adalah

sebagai berikut: pertama-tama disiapkan 8 buah bejana kaca dan masing-masing bejana disiapkan pada tempatnya (diberi nomor sesuai arah jarum jam) pada alat *tissue processor*. Secara umum proses dehidrasi dan pembedahan melalui larutan-larutan sebagai berikut: Ke dalam masing-masing bejana diisi larutan etanol 70% (no.1), 80% (no.2), 90% (no.3), etanol absolut I (no.4), etanol absolut II (no.5), xilen I (no.6), xilen II (no.7), xilen III (no.8). Jika diperlukan, pada bejana no.5 dimasukkan kristal CuSO_4 , sebagai indikator apakah organ sudah bebas dari air. Jika organ masih mengandung air (ditunjukkan oleh kristal CuSO_4 yang berwarna biru), maka proses perendaman dengan etanol absolut II diulangi sampai organ bebas air. Lamanya perendaman diatur dengan cara membuka lempeng pengaturan waktu, kemudian waktu perendaman diatur dari masing-masing bejana sebagai berikut: bejana no.1; 2; 3; 4; 5 dan 6 diatur selama 2,5 jam, bejana no.7; 1,5 jam, bejana no.8; 2 jam. Lalu mesin dihidupkan untuk memulai proses dehidrasi, preparat dari bejana no.1 secara otomatis berpindah tempat ke tempat bejana no 2; 3; 4; 5; 6; 7 dan 8. Proses infiltrasi (perendaman di dalam parafin cair) pada bejana berukuran 1 liter sebanyak 3 buah (bejana I; II; III) berisi parafin cair yang suhunya dipertahankan 56-58°C (dalam lemari pemanas) disiapkan. Selanjutnya dilakukan proses pembersihan organ dengan cara memasukkan kantong-kantong organ yang telah mengalami proses dehidrasi dan dekalsifikasi kedalam bejana ke I; II dan III masing-masing selama 60 menit secara berurutan.

h. Pembuatan sediaan blok menggunakan alat *paraffin embedding console*.

Beberapa cawan porselin berukuran 9 x 5,5 x 1,5 cm disiapkan dan dipanaskan diatas api bunsen. Kedalam cawan dituangkan parafin cair. Kantong organ yang terendam dalam bejana yang berisi parafin cair dibuka dan organ segera dimasukkan ke dalam cawan porselin yang telah berisi parafin cair, organ diatur sedemikian rupa sehingga permukaan organ yang akan dipotong ditempelkan pada cawan porselin. Satu cawan diisi 8 – 10 organ. Selanjutnya cawan yang berisi organ dibiarkan membeku. Kemudian cawan direndam dalam air kira-kira 60 menit lalu disimpan di dalam lemari es selama 12 jam. Setelah itu parafin yang berisi organ yang telah beku dikeluarkan dari cawan dan blok parafin dipotong berdasarkan kelompok organ, potongan dibuat dengan ukuran 2 x 2 cm. Selanjutnya potongan blok parafin dilekatkan pada permukaan blok kayu yang berukuran 3 x 2,5 x 1,5 cm. Dalam satu kaset terdapat 4 permukaan yang licin untuk menempelkan 4 potongan blok parafin dan 2 permukaan kayu yang kasar untuk menulis kode dan tempat penjepit pada mikrotom.

i. Pemotongan tipis organ

Potongan-potongan organ yang sudah ditanam dalam blok parafin dan dilekatkan pada kaset, dipotong menjadi sayatan tipis menggunakan mikrotom dengan ketebalan 3-5 μm .

j. Perekatan pita paraffin potongan tipis organ ke kaca preparat (*Mounting*)

Setelah memperoleh potongan yang bagus, potongan tersebut diambil dengan pinset, dimasukkan ke dalam bak yang berisi air hangat dengan suhu 56 – 58^o sehingga pita potongan parafin meregang dan selanjutnya segera diambil menggunakan kaca obyek dengan menghindari pelipatan/kerutan pada pita parafin. Satu kaca obyek dapat digunakan untuk beberapa organ tetapi harus dari satu hewan. Selanjutnya sediaan/preparat dikeringkan dengan cara disimpan dalam ruang terbuka suhu kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) atau disimpan dalam incubator ($\pm 37^{\circ}\text{C}$) selama semalam untuk kemudian dilanjutkan dengan proses pewarnaan.

k. Pewarnaan jaringan

Ada dua macam pewarnaan organ yaitu pewarnaan umum menggunakan Hematoksilin-Eosin untuk mewarnai intisel dan sitoplasma dan pewarnaan khusus antara lain: pewarnaan Sudan III, pewarnaan asam periodat Schiff/PAS, pewarnaan azan, pewarnaan biru Berlin yang disesuaikan dengan tujuannya.

1. Pewarnaan umum - Hematoksilin Eosin

Pewarnaan dapat dilakukan dengan menggunakan mesin otomatis sebagai berikut: pertama-tama bejana no.1 dan 2 masing-masing diisi dengan xilen 100%, bejana no.3 dan 4 dengan etanol absolut, bejana no.5 dengan etanol 90%, bejana no.6 dengan etanol 80% dan bejana no.7 dengan etanol 70%. Setelah itu tuas pengatur waktu diatur sesuai waktu dari masing-masing bejana. Selanjutnya sediaan histopatologi diletakkan dalam keranjang khusus, lalu mesin dihidupkan dan sediaan pertama-tama direndam didalam bejana no.1 dan 2 untuk proses deparafinasi masing-masing selama 12 menit sambil digoyang, dilakukan dehidrasi dengan merendam preparat dalam etanol absolut I dan II masing-masing selama 5 menit, dipindahkan ke dalam etanol 90; 80 dan 70% masing-masing selama 5 menit, dimasukkan dalam air mengalir selama 12 menit, direndam dalam larutan hematoksilin Mayer selama 5 menit, dicuci dalam air mengalir selama 2 x 12 menit, pewarnaan dengan eosin 0,25% selama 12 menit, dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan dehidrasi dengan mencelupkan dalam etanol 70% sebanyak 8 kali, dimasukkan dalam

etanol 80; 90 % dan etanol absolut I dan II masing-masing selama 10 menit. Terakhir dimasukkan ke dalam xilen I, II, III masing-masing selama 12 menit. Kemudian kaca obyek ditutup dengan kaca penutup memakai perekat eukit. Preparat diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran yang sesuai. Inti sel akan tampak berwarna biru kelabu dan sitoplasma merah muda.

2. Pewarnaan Sudan III

Organ segar tanpa diproses, disayat beku dengan mikrotom setebal 10 μ m dan langsung diwarnai. Proses pewarnaan dilakukan sebagai berikut: potongan organ dimasukkan cawan petri yang berisi air selama 2 – 3 menit, etanol 50% selama 2 – 3 menit, larutan Sudan III pada suhu 30^o C selama 30 menit, etanol 50%, dicuci dengan air, larutan Hematoksilin Mayer selama 2 – 3 menit, ditutup dengan kaca penutup, direkatkan dengan gliserin yang diteteskan pada bagian tepi kaca penutup. Preparat diamati dibawah mikroskop binokuler dengan pembesaran yang sesuai. Globul lemak akan tampak berwarna merah jingga.

3. Pewarnaan Asam Periodat – Schiff (PAS)

Sayatan jaringan dideparafinisasi dan didehidrasi, kemudian dilakukan proses pewarnaan dengan urutan sebagai berikut: dicuci dengan air selama 5 menit, direndam dalam asam periodat 0,5% selama 10 menit, dicuci dengan air selama 5 menit, direndam dalam larutan natrium bisulfit I, II, III masing-masing selama 3 menit, dicuci dengan air selama 5 menit, direndam dalam larutan Hematoksilin Mayer selama 52 menit, dicuci dalam air selama 5, dilakukan proses dehidrasi, dimasukkan ke dalam xilen I, II, III masing-masing selama 12 menit. Kemudian kaca obyek ditutup dengan kaca penutup memakai perekat eukit. Preparat diamati dibawah mikroskop binokuler dengan pembesaran yang sesuai. Polisakarida akan tampak berwarna merah.

4. Pewarnaan Azan

Sayatan jaringan dideparafinisasi dan didehidrasi, dicuci dengan air selama 5 menit kemudian dilakukan proses pewarnaan dengan urutan sebagai berikut: direndam dalam larutan azokarmin G pada suhu 56 – 60^oC selama 60 menit, didinginkan, dicuci dengan air, direndam dalam larutan anilin 1% dalam etanol 95% sampai spesimen berwarna merah muda, dicuci dengan asam asetat 1% dalam etanol 95% selama 2 menit, direndam dalam larutan asam fosfotungstat 5% selama 60 menit, dicuci dengan air, direndam dalam anilin biru jingga G selama 60 menit, dan berturut turut direndam dalam etanol absolut I, II, III masing-masing selama 5 menit, direndam dalam xilen I selama 5 menit, xilen II selama

30 menit ditutup dengan kaca penutup, direkatkan dengan perekat eukit. Preparat diamati dibawah mikroskop binokuler dengan pembesaran yang sesuai. Pada preparat akan tampak: musin berwarna biru, inti sel dan sel darah merah berwarna merah, otot dan granula asidofilik berwarna jingga merah, dan neuroglia berwarna pucat.

5. Pewarnaan Biru Berlin

Sayatan jaringan dideparafinisasi dan didehidrasi, dicuci dengan air selama 5 menit kemudian dilakukan proses pewarnaan dengan urutan sebagai berikut: direndam dalam larutan ferosianida selama 30 menit, dicuci dengan air, direndam dalam larutan *Nuclear fast red* selama 2 menit, dicuci dengan air, dilakukan dehidrasi, dimasukkan ke dalam xilen I, II, III masing-masing selama 12 menit. Kemudian kaca obyek ditutup dengan kaca penutup memakai perekat eukit. Preparat diamati dibawah mikroskop binokuler dengan pembesaran yang sesuai. Pigmen hemosiderin akan tampak berwarna coklat kekuningan.

1. Analisis Histopatologi.

Analisis histopatologi direkomendasikan dilakukan oleh dokter hewan yang memiliki keahlian patologi dengan brevet Ahli Patologi Veteriner (APVet.)

CC. Penentuan tahap siklus proestrus pada tikus betina dewasa

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menentukan tahap siklus proestrus pada tikus betina dewasa

Prinsip

Tahap siklus proestrus pada tikus betina dewasa dapat ditentukan dari perbandingan komposisi sel epitel berinti, sel epitel bertanduk dan leukosit dalam apusan vaginanya.

Bahan

Natrium klorida 0,9 %

Alat

Mikroskop dengan pembesaran 100 x

Kandang bersekat

Pipet tetes yang telah ditumpulkan ujungnya

Kaca objek

Kertas dokumentasi

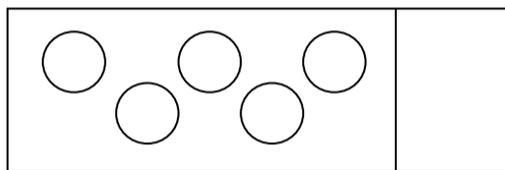
Penyiapan sediaan

Larutan natrium klorida 0,9 %

Sejumlah 0,9 g natrium klorida dilarutkan dalam air hingga 100 mL

Prosedur

Tikus betina dari masing-masing kandang secara berurutan diambil, kemudian ke dalam lubang vaginanya dimasukan ujung pipet yang telah berisi larutan natrium klorida 0,9 % secukupnya. Dengan perlahan-lahan dan hati-hati larutan tersebut disemprotkan dan disedot dengan pipet beberapa kali di dalam vagina, kemudian cairan vagina diambil sedikit dengan pipet dan ditetaskan secukupnya pada kaca objek sambil diratakan. Selanjutnya tikus dimasukan dalam kandang khusus untuk *smear* secara berurutan. Cairan vagina diperiksa dibawah mikroskop pada pembesaran 100 x, dilihat adanya sel epitel berinti, sel epitel bertanduk, leukosit dan lendir. Satu kaca objek dapat digunakan untuk lima cairan vagina dari 5 ekor tikus, sedang cara penempatannya seperti Gambar 14.

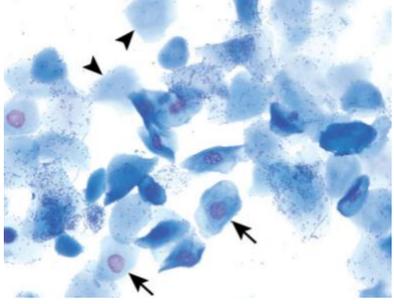
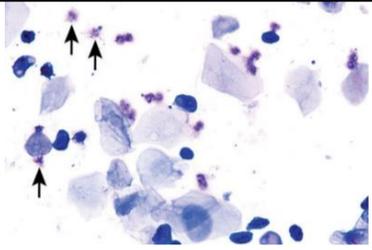


Gambar 14. Posisi penempatan cairan vagina pada kaca objek

Penetapan tahap siklus dilakukan dengan penilaian seperti pada Tabel 26 dan hasilnya dicatat pada kertas dokumentasi siklus proestrus.

Tabel 26. Penilaian tahap siklus estrus

Tahap	Apusan Vagina				
	Sel epitel berinti	Sel epitel bertanduk	Leukosit	Lendir	Gambar sel hasil apusan (Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015).)
Proestrus	+++	+	±	-	

Estrus	-	+++	±	-	
Metestrus	-	++	++/+++	-	
Diestrus	± (ada diakhir)	-	+ / ++ / +++ +	+	
Gambar sel hasil apusan					

Keterangan:

+++ sangat banyak

++ banyak

+ sedikit

± kadang - kadang

- tidak ada

DD. Pembuktian terjadinya perkawinan pada tikus

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk membuktikan terjadinya perkawinan antara tikus betina dewasa yang telah disatukan dengan tikus jantan dalam satu kandang.

Prinsip

Vagina tikus betina yang baru kawin mengalami perkawinan adakalanya ditutupi sumbat vagina atau terdapat sperma pada apusan vaginanya.

Bahan

Natrium klorida 0,9 %

Alat

Mikroskop dengan pembesaran 100 x dan kandang bersekat

Pipet tetes yang telah ditumpulkan ujungnya dan kaca objek

Penyiapan sediaan

Larutan natrium klorida 0,9 %

Sejumlah 0,9 g natrium klorida dilarutkan dalam air hingga 100 mL

Prosedur

Tikus betina yang telah disatukan dengan tikus jantan diambil dari masing-masing kandang secara berurutan kemudian diamati vaginanya. Bila pada pengamatan ditemukan bercak sumbat vagina, tikus dinyatakan telah kawin. Bila sumbat vagina tidak ditemukan, harus dilanjutkan dengan membuat apusan vagina untuk pembuktian perkawinan. Ke dalam lubang vaginanya dimasukkan pipet (telah ditumpulkan ujungnya) yang berisi larutan natrium klorida 0,9 % secukupnya. Dengan perlahan-lahan dan hati-hati larutan tersebut disemprotkan dan disedot dengan pipet beberapa kali ke dalam vagina, kemudian cairan vagina diambil sedikit dengan pipet dan diteteskan secukupnya pada kaca objek sambil diratakan, selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop dibawah pembesaran 100 x. Tikus dinyatakan kawin apabila pada cairan apusan vagina ditemukan sperma. Satu kaca objek dapat digunakan untuk pemeriksaan cairan vagina 5 ekor tikus yang berlainan.

EE. Alokasi hewan kedalam kelompok perlakuan

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menentukan secara acak perlakuan terhadap masing-masing tikus betina dewasa yang telah terbukti kawin pada uji teratogenisitas.

Prinsip

Setiap subpopulasi hewan dalam populasi yang homogen akan memberikan respon yang sama terhadap perlakuan dan/atau peristiwa yang sama dan respon yang berbeda terhadap perlakuan dan/atau peristiwa yang berbeda.

Hewan uji

Tikus betina, sehat, muda, dewasa yang terbukti kawin.

Alat

Alat hitung (kalkulator)

Prosedur

Alokasi acak dilakukan untuk membentuk kelompok-kelompok hewan dengan populasi yang homogen serta mengusahakan kemungkinan kehamilan dan bobot tubuh rata-rata yang hampir sama antar kelompok dosis. Bila tidak

dinyatakan lain, alokasi sebaiknya dilaksanakan satu hari sebelum pemberian sediaan uji. Pada alokasi dipertimbangkan:

1. Kemungkinan kehamilan, dengan menyesuaikan bobot tubuh pada hari ke-nol, bobot tubuh pada hari alokasi, kenaikan bobot tubuh antara hari ke-nol dan hari alokasi, pembesaran pada bagian perut
2. Bobot tubuh rata-rata antara tiap kelompok dosis
3. Kemungkinan kematian induk karena keracunan sediaan uji (terutama pada dosis tertinggi)

Pada hari pembuktian perkawinan, betina yang terbukti kawin ditimbang dan diletakkan dalam kandang individual secara berurutan, diberi nomor hewan dan tanggal pembuktian perkawinan. Pada hari alokasi, betina ditimbang dan kenaikan bobot tubuh antara hari ke-1 dan hari alokasi dihitung. Berdasarkan kenaikan bobot tubuh dari yang terbesar ke arah yang lebih kecil, mula-mula hewan direncanakan untuk ditempatkan mulai dari kelompok kontrol, dosis terendah hingga dosis tertinggi, lalu kembali lagi dari dosis tertinggi ke dosis terendah dan kontrol, demikian berulang-ulang secara berurutan. (Pembatasan pemakaian hewan yang memiliki kenaikan bobot tubuh rendah diperlukan untuk meningkatkan kemungkinan kehamilan). Kemudian bobot tubuh rata-rata tiap kelompok dosis dihitung. Bila bedanya tidak terlalu besar, maka rencana pertama dapat dijalankan, tetapi bila bedanya terlalu besar, penggantian penempatan hewan dapat dilakukan dengan perubahan sekecil mungkin. Untuk perubahan ini perlu diperhatikan agar:

1. Sasaran untuk mencapai bobot tubuh rata-rata antar kelompok dosis yang kurang lebih sama dapat dicapai setelah perubahan;
2. Hewan yang diganti tempatnya memiliki kenaikan bobot tubuh yang tidak terlalu jauh berbeda.

Pada alokasi berikutnya, pengelompokan hewan dilakukan dengan cara yang sama dan melanjutkan pengelompokan sebelumnya dengan tetap mempertimbangkan bobot tubuh rata-rata tiap kelompok dosis dari data alokasi sebelumnya. Hasil alokasi dicatat pada label di tiap kandang hewan dan kertas dokumentasi.

FF. Pembedahan dan pengamatan teratologi umum tikus

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk melakukan pembedahan dan pengamatan teratologi umum pada semua tikus betina dewasa yang telah terbukti kawin.

Prinsip

Setelah tikus betina dewasa terbukti kawin pada hari ke-0, hewan coba dibedah diamati fetusnya

Hewan uji

Tikus betina, sehat, muda, dewasa yang terbukti kawin.

Bahan

Trinitrofenol (asam pikrat)

Larutan formaldehid

Asam asetat glasial

Etanol

Anastesi

Desinfektan

Alat

Seperangkat alat bedah

Nampan bedah

Wadah penganestesi

Kaca pembesar

Timbangan (ketelitian 10 mg)

Kertas dokumentasi "Pembedahan Teratologi"

Botol fiksasi untuk untuk preparat jaringan lunak

Kotak fiksasi untuk preparat kerangka

Kamera dan film

Botol preparat tunggal

Kertas tisu

Penyiapan sediaan

1. Larutan Bouin

Sejumlah 1000 mL larutan jenuh trinitrofenol (asam pikrat) dalam aquadest yang telah didiamkan satu malam dan disaring, dicampur dengan 333 mL larutan formaldehida dan 67 mL asam asetat glasial.

2. Etanol 90 %

Sejumlah 2700 mL etanol dicampur dengan aquadest hingga 3000 mL

3. Larutan Formaldehida 10 %

Sejumlah 10 mL larutan formaldehida dicampur dengan aquadest hingga 100 mL

Prosedur

1. Pembedahan

Tikus yang akan dibedah ditimbang bobot tubuh dan konsumsi makanannya. Sebelum dibedah tikus dibunuh dengan eter. Tikus yang sudah mati diletakkan terlentang di nampan, permukaan perutnya dibasahi dengan kapas basah. Kulit perut bagian luar tepat diatas perineum ditarik sedikit dengan pinset dan ditakik dengan gunting ujung runcing. Takikan kulit dipotong searah dengan garis tengah sampai ke sternum dengan gunting ujung tumpul, kemudian sisi kanan dan kiri digunting pada masing-masing ujung potongan, dipisahkan dari jaringan dibawahnya dengan gunting.

Dinding peritoneal tepat diatas perineum dipotong, sehingga uterus yang berisi fetus dan ovarium dapat terlihat jelas. Setelah itu uterus dibebaskan dari organ dalam yang lain, dikeluarkan dan dibebaskan. Jumlah fetus pada sisi kanan dan kiri uterus (sisi kiri dan kanan pembedah) dihitung dan dicatat dalam kertas dokumentasi. Vagina harus dipotong melintang (tidak boleh terdapat fetus atau plasenta didalamnya) dan mesenterium digunting sehingga uterus dan ovarium dapat diangkat dan dipindahkan ke dalam nampan (tanpa merubah posisi kanan dan kiri). Dengan menggunakan pinset kecil dan gunting ujung tumpul uterus kanan (sisi kiri pembedah) dibuka lebih dulu, mulai dari pangkal pertemuan vagina dan uterus, sepanjang permukaan antemesometrial sampai ovarium. Segala sesuatu yang tertanam (*implant*) pada uterus dinilai mulai dari vagina sampai ovarium dan diklasifikasikan sebagai berikut:

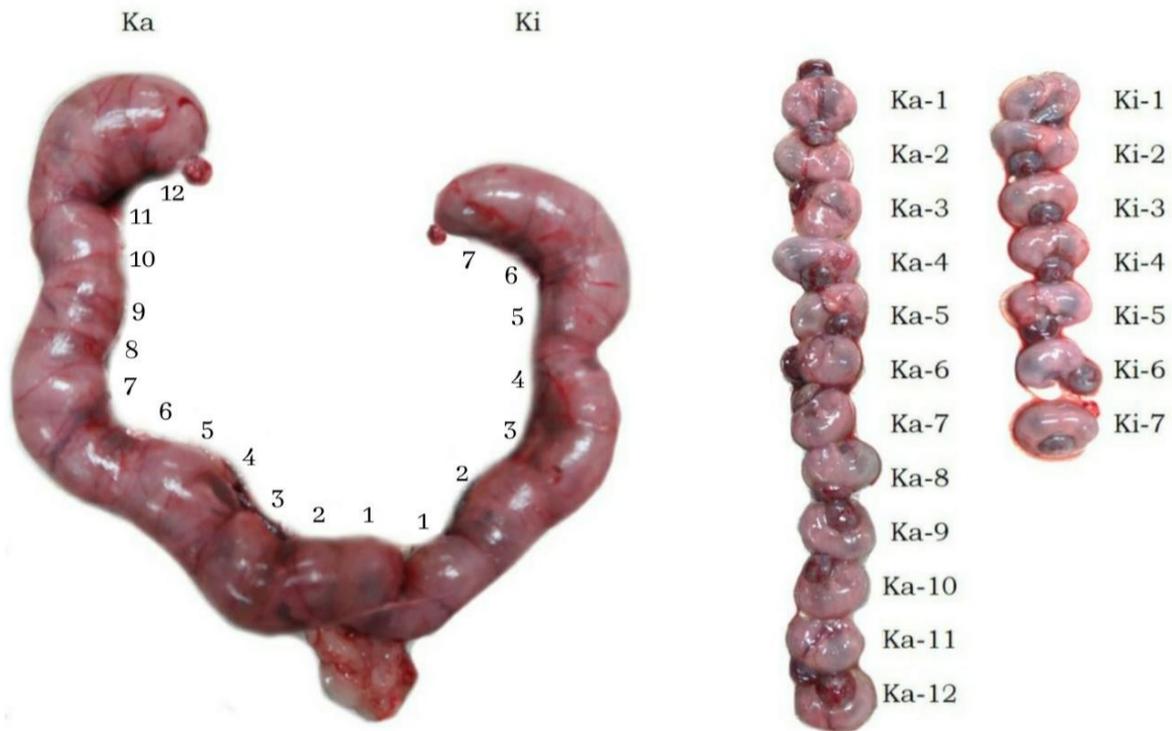
a. Hidup

b. Kematian fetus (foetal death/FD), fetus baru saja mati, bentuknya lengkap, tapi warnanya lebih pucat dari normal

c. Kematian lambat (*late death*, LD), organogenesis telah terjadi sehingga embrio sudah tampak tetapi perkembangannya tidak sampai ke tingkat fetus.

d. Kematian awal (*early death*, ED), kematian terjadi sesaat setelah implantasi sehingga embrio belum tampak, *implant* berupa jaringan timbul dari plasenta yang berdegenerasi.

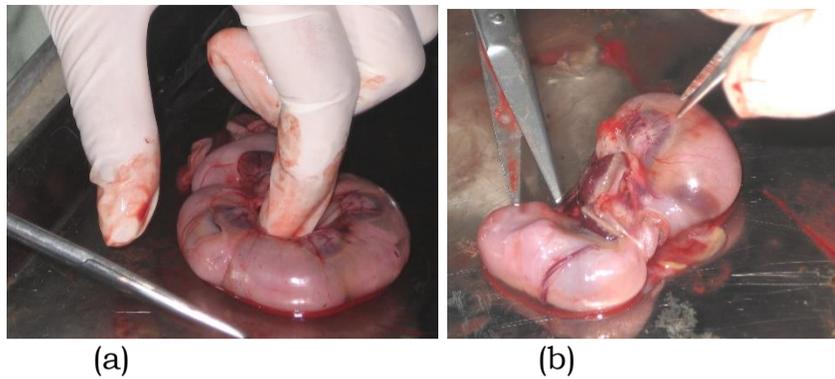
Setelah endometrium diantara tiap *implant* diperiksa secara teliti agar tidak ada yang lolos dari pengamatan, semua data berupa jumlah total dan untuk masing-masing sisi kanan dan kiri uterus dari tiap klasifikasi *implant* serta tempat implantasinya dicatat pada kertas dokumentasi “Pembedahan Teratologi”. Fetus-fetus harus dipindahkan secara berurutan, mulai dari pangkal uterus kanan (sisi kiri pembedah) sampai ovarium (Gambar 15).



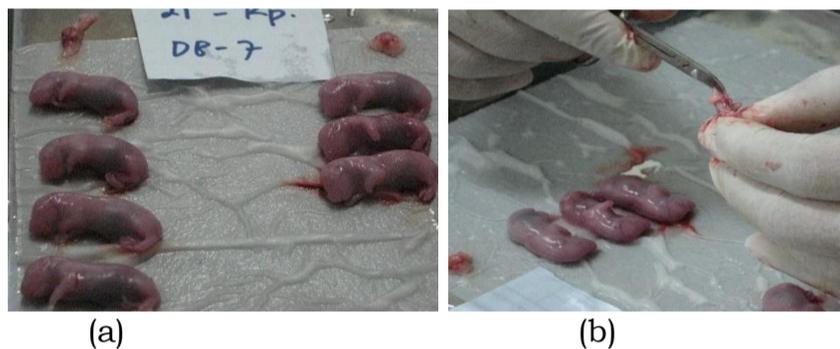
Gambar 15. Diagram penempatan fetus pada nampan bedah (sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

Selaput yang membungkus fetus hidup digunting secara hati-hati menggunakan gunting ujung tumpul, fetus diangkat dan dilepas dari selaput, tali umbilikal dijepit dan dipotong dekat umbilikus dan fetus diletakkan pada nampan. *Implant* yang mati (sisa atau plasenta utuh dan sisa atau fetus utuh pada kematian awal, lambat dan kematian fetus) dilepas dari endometrium menggunakan pinset ujung tumpul, kemudian diletakkan pada tempat yang sesuai dalam nampan yang sama.

Ovarium kanan (sisi kiri pembedah) dipisahkan dari uterus dan diletakkan dalam nampan disebelah atas deretan fetus, perlakuan sama dilakukan terhadap ovarium kiri. Bagian luar fetus diamati secara teliti mulai dari kepala sampai ekor, jenis kelamin. Selaput ovari dibuka, jumlah korpora lutea dihitung (Gambar 16).



Gambar 16. Proses pengeluaran fetus (a) dari uterus, (b) dari selaput ovari
Setelah dikeluarkan dari selaput ovari, kemudian dilakukan penilaian anatomi eksternal fetus, termasuk penentuan jenis kelaminnya (Gambar 17).



Gambar 17. Penempatan fetus sesuai urutan (a), penilaian fetus (b)

Bila ditemukan adanya malformasi pada fetus sebaiknya diawetkan, di masukan ke dalam botol preparat tunggal yang berisi larutan formaldehida 10 % dan diberi label dengan nama sediaan uji, nomor induk, implant. Semua hasil pengamatan dan tindakan pengawetan dicatat pada kertas dokumentasi “Pembedahan teratologi”.

2. Penimbangan Fetus

Tiap fetus harus dibersihkan dari cairan dan darah yang menempel dengan kertas saring sebelum ditimbang dan data penimbangan dicatat pada kertas dokumentasi.

3. Fiksasi Fetus

Pengawetan fetus dipertimbangkan berdasarkan keadaan abnormalitasnya. Jumlah fetus untuk penilaian kerangka 1 bagian dan jaringan lunak 2 bagian, prioritas pertama penilaian adalah fetus dengan nomor urut 1,4,7,10 dst untuk penilaian kerangka, selanjutnya fetus dengan nomor 2,3,5,6 ... dst untuk penilaian jaringan lunak. Ketentuan tersebut tidak mutlak, nomor urut fetus yang akan dinilai bisa dirubah sesuai dengan prioritas abnormalitasnya dengan tetap memperhatikan perbandingan jumlah fetus.

- a. Untuk penilaian preparat kerangka: fetus dimasukkan kedalam kotak fiksasi yang berisi larutan etanol 90 % dan diberi nomor induk serta nomor fetus
- b. Untuk penilaian jaringan lunak: fetus diikat satu-persatu secara berurutan sehingga dapat ditelusuri nomornya, diberi nomor induk dan dimasukkan ke dalam botol yang berisi larutan Bouin

GG. Pembuatan preparat kerangka fetus tikus

Ruang lingkup

Cara membuat preparat kerangka fetus tikus

Prinsip

Kerangka fetus diwarnai oleh larutan pewarna alizarin setelah fetus menjalani proses dehidrasi, pembersihan, penjernihan dan pemutihan

Bahan

Etanol

Kalium hidroksida

Hidrogen peroksida

Natrium alizarin sulfonat

Gliserol

Timol

Alat

Kotak preparat

Timbangan (ketelitian 10 mg)

Pengaduk magnetik

Papan gabus

Pisau mikrotom

Nampan bedah

Potongan-potongan kaca objek

Kertas tissue

Penyiapan sediaan

1. Etanol 90 %

Sejumlah 2700 mL etanol dicampur dengan aquadest hingga 3000 mL

2. Larutan kalium hidroksida 0,5 %

Sejumlah 15 g kalium hidroksida dilarutkan dalam aquadest hingga 3000 mL

3. Larutan hidrogen peroksida 1 %
Sejumlah 30 mL larutan hidrogenperoksida dicampur dengan aquadest hingga 3000 mL.
4. Larutan natrium alizarin sulfonat 1 %
Sejumlah 1 g natrium alizarin sulfonat dilarutkan dalam aquadest hingga 100 mL.
5. Larutan pewarna alizarin
Sejumlah 6 g kalium hidrogen dilarutkan dalam aquadest, ditambahkan 15 mL larutan natrium alizarin sulfonat 1 % dan aquadest hingga 3000 mL.
6. Larutan gliserol 5 %
Sejumlah 15 g kalium hidroksida dilarutkan dalam aquadest, ditambahkan 150 mL gliserol dan aquadest hingga 3000 mL
7. Larutan gliserol 20 %
Sejumlah 15 g kalium hidroksida dilarutkan dalam aquadest ditambahkan 600 mL gliserol dan aquadest hingga 3000 mL
8. Larutan gliserol 40 %
Sejumlah 15 g kalium hidroksida dilarutkan dalam aquadest, ditambahkan 1200 mL gliserol dan aquadest hingga 3000 mL
9. Larutan gliserol 80 %
Sejumlah 15 g kalium hidroksida dilarutkan dalam aquadest, ditambahkan 2400 mL gliserol dan aquadest hingga 3000 mL

Prosedur

1. Pembuangan kulit dan organ bagian dalam

Fetus yang telah difiksasi dalam larutan etanol 90 % selama 2 minggu diambil dari kotak fiksasi dan dikeringkan menggunakan kertas tisu dengan memperhatikan kesesuaian identitas induk dan fetus. Setelah fetus dikuliti secara sempurna, mata serta gumpalan lemak di tengkuk dan bawah kulitnya dilepaskan dan trakea dipotong. Ketiak kaki dan tangan disayat agar tidak menempel pada badan, dinding perut dirobek dan jenis kelamin fetus diperiksa. Kemudian isi rongga perut dan dada dikeluarkan (tanpa membuka rongga dada; rongga dada kelinci boleh dibuka tetapi tidak memotong sternum), organ diperiksa terhadap kelainan penampilan, struktur, jumlah lobus hati dan paru-paru, ukuran dan posisi, terutama pada diafragma, lambung, hati, kantong empedu (hanya pada kelinci), limpa, ginjal, kelenjar anak ginjal, rahim, ovari atau testes, kandung kencing, paru, jantung dan kelenjar timus. Melalui pusat ginjal dapat dibuat potongan melintang menggunakan pisau mikrotom, permukaan potongan diperiksa. Melalui bilik jantung (ventrikel) dapat dibuat potongan garis tengah menggunakan pisau mikrotom, sekat antar bilik (ventrikel

septum) dan bagian dalam jantung dapat diperiksa. Setelah dikuliti dan dibuang organ dalamnya fetus dikembalikan ke dalam kotak fiksasi. Semua kelainan yang ditemui dicatat pada kertas dokumentasi, bila perlu dibuat gambar/fotonya.

2. Pewarnaan Kerangka

a. Penjernihan

Setelah seluruh fetus didalam kotak fiksasi selesai dikuliti dan dibuang organ bagian dalamnya, fetus ditempatkan dalam kotak fiksasi yang berisi larutan kalium hidroksida 0,5 % selama lebih kurang 24 jam sambil beberapa kali fetus digoyang untuk mengeluarkan udara dari rongga dada. Penjernihan dianggap sempurna jika kerangka terlihat diantara jaringan sekitar yang jernih.

b. Pemutihan

Setelah penjernihan sempurna, larutan kalium hidroksida 0,5 % dibuang, fetus dibilas dengan air dan sisa-sisa jaringan lemak dibuang. Kemudian air diganti dengan larutan hidrogen peroksida 1 % selama lebih kurang 2-3 jam sambil beberapa kali fetus digoyang untuk mengeluarkan udara dari rongga dada. Pemutihan dianggap sempurna jika bagian dalam tulang berwarna putih.

c. Pewarnaan

Setelah pemutihan sempurna, fetus digoyang untuk mengeluarkan udara dan larutan hidrogen peroksida 1 % dibuang. Kemudian fetus dibilas dan direndam lebih kurang 10 menit dalam air, lalu air diganti dengan larutan pewarna alizarin dan fetus dibiarkan tenggelam dalam larutan selama tidak lebih dari 24 jam, jika perlu dengan bantuan penekanan menggunakan potongan kaca objek. Pewarnaan dianggap sempurna jika kerangka telah terlihat jelas.

d. Pembersihan akhir

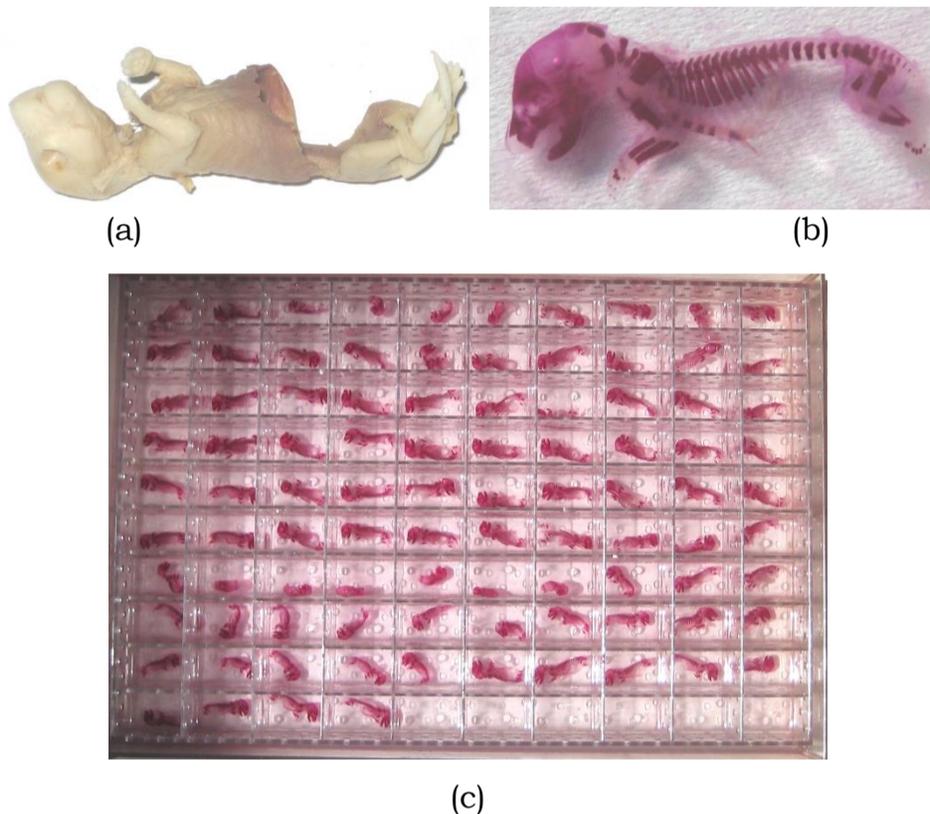
Setelah pewarnaan sempurna, larutan pewarna alizarin dibuang, fetus dibilas dengan air beberapa kali, kemudian direndam secara bertahap dalam larutan gliserol 5; 20; 40 dan 80 % dalam KOH selama masing-masing 1 minggu.

3. Penilaian Kerangka

Penilaian kerangka dilakukan setelah preparat direndam dalam larutan gliserol 80 % selama paling sedikit 1 minggu dengan cara seperti yang tertera pada Lampiran 29.

4. Penyimpanan

Kerangka yang telah dinilai disimpan dalam gliserol murni dan ditambahkan sedikit kristal timol untuk mencegah pertumbuhan jamur (Gambar 18).



Gambar 18. Penyimpanan kerangka fetus; (a) fetus yang telah dibuang kulit dan organ bagian dalam (b) kerangka fetus yang telah diwarnai dengan alizarin (c) kerangka fetus dalam kotak fiksasi

HH. Penilaian kerangka fetus tikus

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk melakukan penilaian terhadap kerangka fetus tikus yang telah diwarnai dengan larutan pewarna alizarin

Prinsip

Penilaian kerangka yang telah diwarnai dengan larutan pewarna alizarin dilaksanakan dengan membandingkannya terhadap kelompok kontrol dan preparat standar yaitu fetus yang berasal dari induk normal tanpa perlakuan yang dipelihara dengan kondisi yang sama dengan percobaan. Penilaian kerangka dilakukan dibawah mikroskop stereo dengan pembesaran 4-10 kali, yang dinilai yaitu ukuran relatif dan absolut tulang, distribusi warna dalam kerangka tanpa memperhatikan kepekatan warna, struktur, morfologi, jumlah, ukuran, posisi tulang serta pengaruh proses pewarnaan, penilaian

Bahan

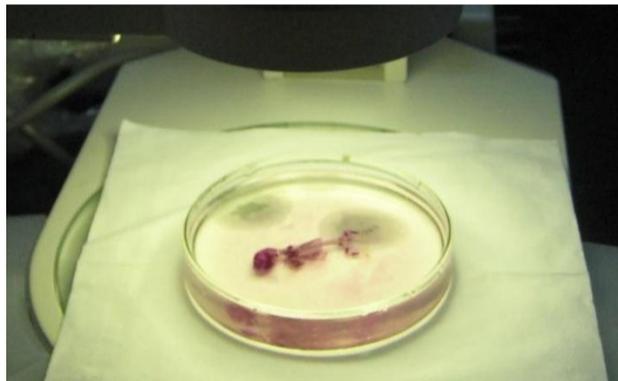
Gliserol 80 %

Alat

Mikroskop stereo / fluoresen dan cawan petri
Sarung tangan plastik dan kertas dokumentasi
Kamera digital
Botol preparat tunggal

Prosedur

Sebuah kerangka dipindahkan dari kotak preparat kerangka ke dalam cawan petri yang berisi larutan gliserol 80 % dan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 4-10 kali. Mula-mula kerangka diamati dan diperiksa bagian belakangnya; tulang tengkorak, kolom tulang belakang dan tulang rusuk. Kemudian kerangka dibalik, diperiksa dan diamati bagian depannya; rongga mulut, tulang sternum, tulang yang melingkari bahu dan pinggul, anggota badan bagian depan dan belakang (Gambar 19). Semua hasil pemeriksaan berupa struktur, morfologi, jumlah, ukuran, posisi tulang dan derajat pewarnaan dicatat pada kertas dokumentasi. Kerangka yang telah dinilai dikembalikan ke dalam kotak preparat kerangka.



Gambar 19. Kerangka fetus untuk pengamatan mikroskopik

II. Penilaian jaringan lunak fetus tikus

Ruang lingkup

Cara melakukan penilaian jaringan lunak dari preparat fetus tikus yang telah difiksasi dalam larutan Bouin.

Prinsip

Setelah fetus difiksasi dalam larutan Bouin dan disayat dengan pola tertentu, penilaian jaringan lunak dilakukan dengan membandingkannya fetus perlakuan terhadap fetus kelompok kontrol atau data kumulatif fetus kontrol

dibawah mikroskop. Pada penilaian jaringan lunak dinilai jumlah, bentuk, ukuran, dan posisi organ.

Bahan

Aquades

Alat

Mikroskop stereo / fluoresen

Lemari pengisap

Pelat tetes

Pisau mikrotom

Papan gabus

Sarung tangan plastik

Kertas dokumentasi

Kamera digital

Prosedur

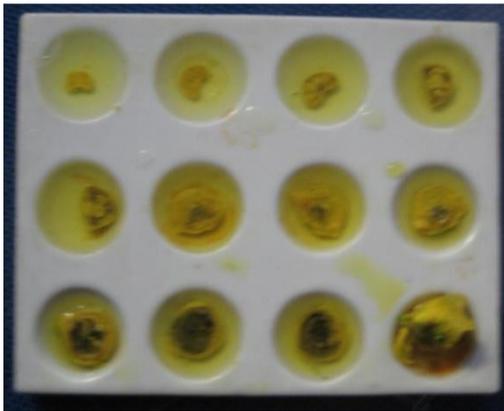
Rangkaian fetus dari satu induk dipindahkan ke dalam gelas piala dan dialiri air perlahan-lahan sampai bau formalin hilang/berkurang, diambil satu fetus, dikeringkan dengan kertas tisu, kepala bagian atas diantara kedua rahang dan disebelah bawah telinga dipotong menggunakan pisau mikrotom, permukaan langit-langitnya diperiksa. Kemudian permukaan langit-langit diletakan disebelah bawah dan sayatan melintang kepala dibuat mulai dari hidung berurut kearah belakang dengan jarak maksimum 1 mm dengan mengutamakan hidung dan mata. Penyayatan dilanjutkan ke rongga dada fetus dari leher kebagian bawah paru-paru hingga diafragma, dilakukan setipis mungkin agar kelainan posisi pembuluh darah dan struktur bagian dalam jantung serta adanya penonjolan "hernia" pada diafragma dapat diperiksa. Sayatan-sayatan diletakan secara berurutan dalam pelat tetes yang berisi aquadest secukupnya hingga sayatan terendam. Selanjutnya kulit disekitar perut ditoreh menggunakan pisau mikrotom, bagian depannya dipotong dan dibuang; organ di dalam rongga perut dikeluarkan secara hati-hati; keadaan hati (jumlah lobus), lambung, pankreas, limpa dan usus diperiksa secara makroskopis. Posisi ginjal, keadaan ureter, kelenjar kelamin dan kandung kencing diperiksa, kedua ginjal harus dipotong melalui bagian tengah dan keadaan pelvis ginjalnya diperiksa. Pelat tetes yang berisi sayatan-sayatan fetus diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 4-10 kali. Semua penyimpangan dari normal dicatat dalam kertas dokumentasi, difoto dan disimpan dalam botol preparat tunggal yang berisi larutan Bouin (Gambar 20).



(a)



(b)



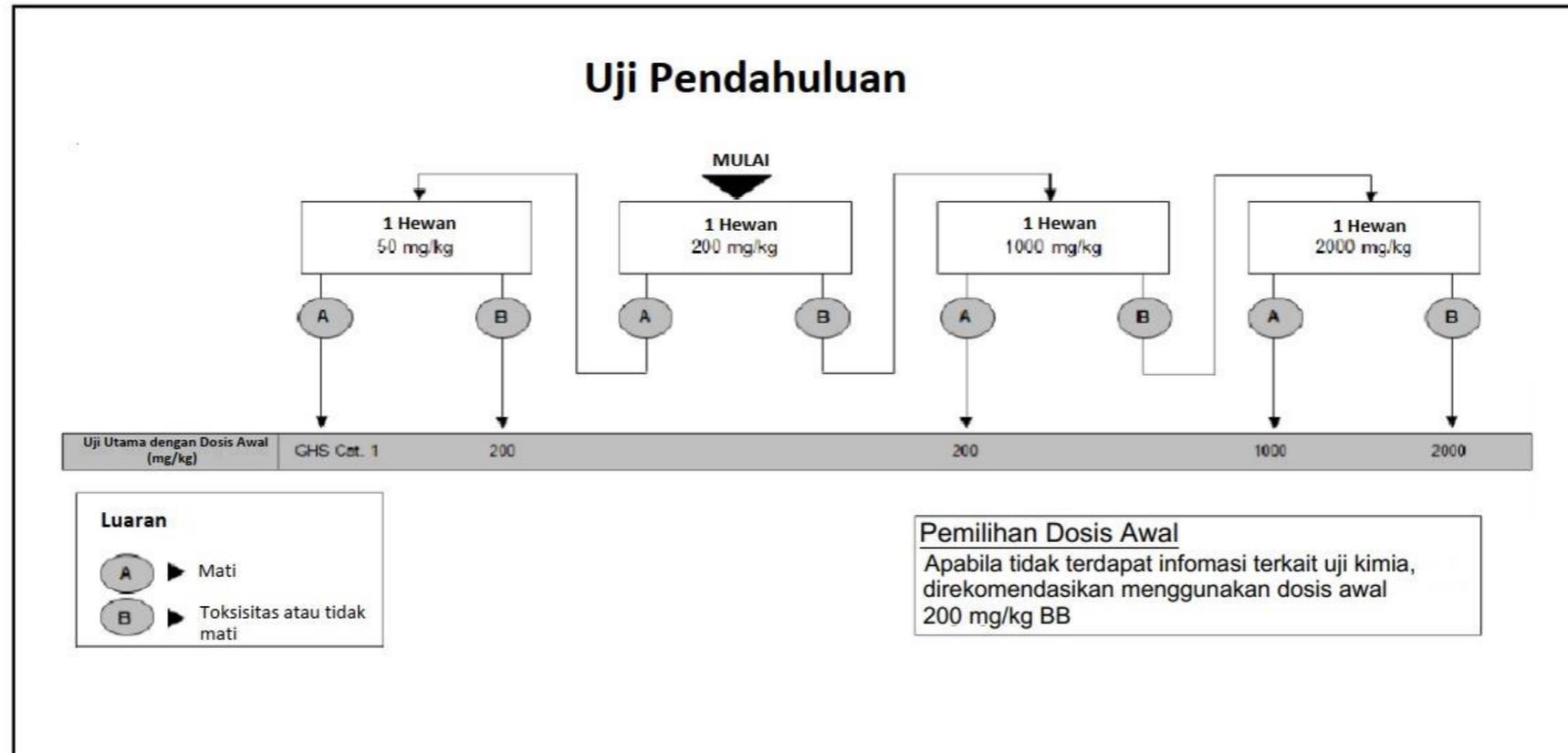
(c)



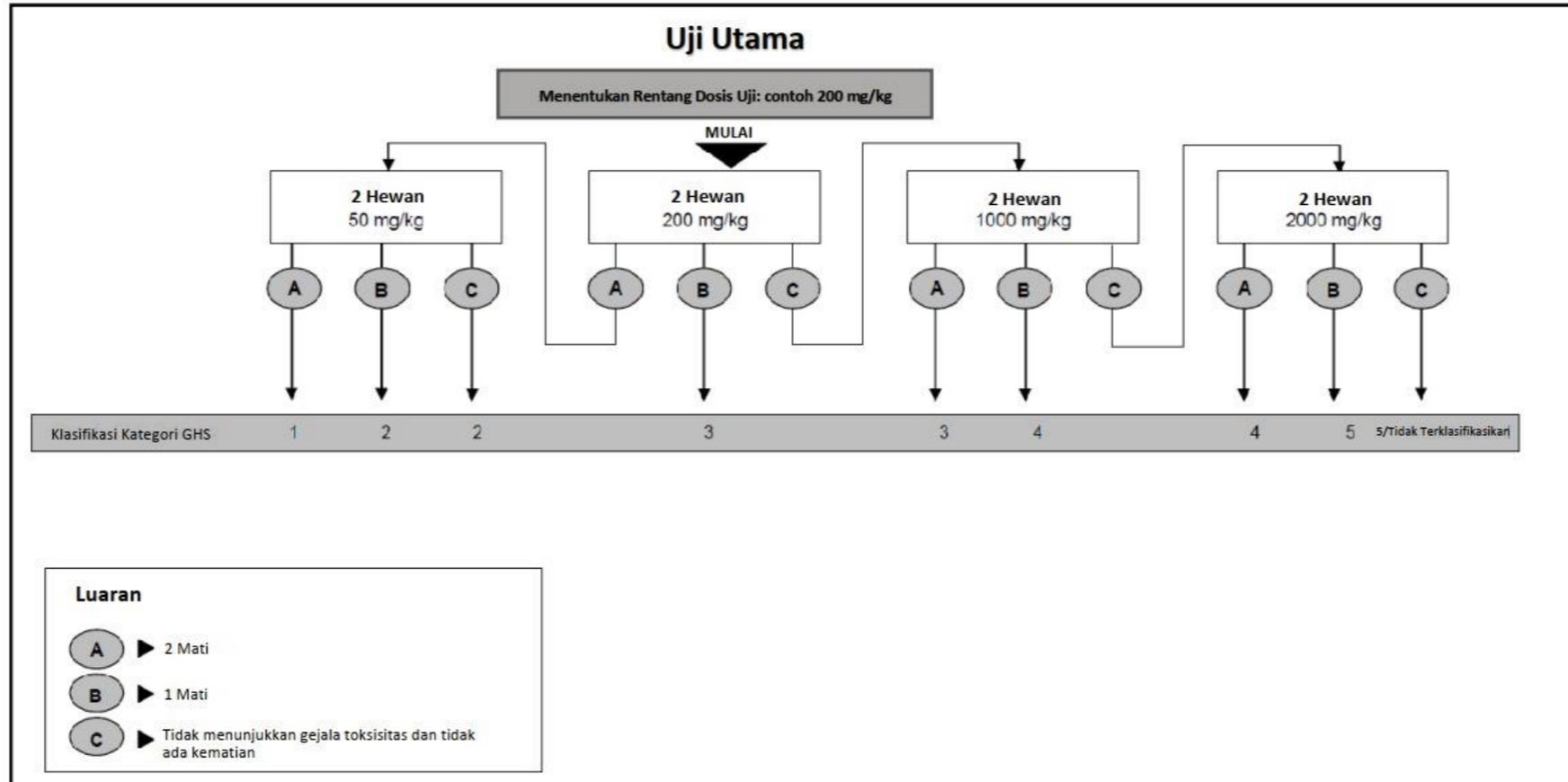
(d)

Gambar 20. Fiksasi fetus. (a) fetus di fiksasi dalam larutan bouin (b) diiris untuk dinilai jaringan lunak (c) irisan fetus yang siap dinilai (d) penilaian irisan fetus dibawah mikroskop

JJ. Bagan uji pendahuluan (*Range-Finding Study*) pada Uji Toksisitas Akut Dermal.



KK. Bagan uji utama (*Main Study*) pada Uji Toksisitas Akut Dermal.



LL. GLOSARIUM

Antikoagulan

Suatu zat yang berfungsi sebagai anti pembekuan darah.

Aklimatisasi

Tindakan pembiasaan/adaptasi hewan coba dalam lingkungan baru (laboratorium) dengan menempatkannya dalam kandang percobaan selama tidak kurang dari 5 hari.

Aseptis

Suatu kondisi yang bebas dari cemaran mikroba.

Dosis

Jumlah sediaan uji yang diberikan, ditulis sebagai berat (mg, g) sediaan uji per berat badan hewan uji (misal: g/kg).

Histopatologi

Ilmu yang mempelajari struktur jaringan dan sel dalam keadaan sakit secara mikroskopis.

Induksi dalam uji sensitisasi

Pemberian sediaan uji secara topikal pada subyek uji dengan maksud agar terjadi sensitisasi kontak.

Masa induksi

Masa yang sekurang-kurangnya 1 minggu setelah pajanan induksi dimana keadaan hipersentivitas telah terjadi.

In vitro

Suatu pengujian yang dilakukan diluar tubuh makhluk hidup, seperti pada sel, bakteri, organ terisolasi.

In vivo

Suatu pengujian yang dilakukan didalam tubuh makhluk hidup, seperti hewan uji.

NOAEL (*No Observed-Adverse-Effect Level*)

Dosis tertinggi yang tidak memberikan efek (negatif) pada percobaan.

Iritasi mata

Perubahan/cedera mata akibat pemberian sediaan uji pada permukaan anterior mata. Bersifat *reversible* dalam pengamatan selama 21 hari setelah pemberian bahan uji.

Korosi mata

Perubahan/cedera mata akibat pemberian bahan uji pada permukaan anterior mata. Bersifat *irreversible* dalam pengamatan selama 21 hari setelah pemberian bahan uji.

Kelompok satelit

2 kelompok hewan uji tambahan yang terdiri atas 5 ekor jantan dan 5 ekor betina per kelompok untuk kontrol dan dosis tertinggi, disamping 4 kelompok uji utama dalam uji toksisitas subkronis yang mendapat perlakuan sama seperti uji utama dan dimaksudkan untuk memeriksa adanya reversibilitas efek toksik, efek toksik yang menetap atau terlambat (*delayed*) setelah pemberian bahan uji dihentikan selama waktu tertentu yang ditetapkan oleh peneliti berdasarkan efek toksik yang diamati.

LD₅₀ (*median lethal dose*) oral

Besarnya dosis tunggal sediaan uji yang diperoleh dari perhitungan statistik yang menyebabkan kematian hewan uji sebanyak 50 % akibat pemberian secara oral. LD₅₀ dinyatakan sebagai berat sediaan uji per berat badan hewan uji (mg/kg).

Iritasi kulit

Cedera kulit *reversible* akibat paparan bahan uji secara dermal.

Korosi kulit

Kerusakan kulit yang bersifat ireversibel (nekrosis) dari epidermis sampai dermis akibat paparan sediaan uji, dapat berupa ulkus, perdarahan, hilangnya warna kulit, alopecia dan timbulnya jaringan parut.

Korosi mata

Kerusakan jaringan mata, atau kerusakan penglihatan yang berat disebabkan oleh pemberian sediaan uji pada permukaan anterior mata, bersifat *irreversible* dalam pengamatan selama 21 hari setelah pemberian bahan uji.

Makropatologi

Ilmu yang mempelajari kelainan organ secara kasat mata.

Moribound

Hewan dalam keadaan sekarat (hampir mati) akibat pemberian sediaan uji yang bersifat toksik, dengan alasan kemanusiaan hewan dibunuh sesuai dengan teknik pembunuhan hewan uji.

Pajanan tantang

Pajanan ulang setelah periode induksi.

Periode induksi pada uji kulit

Waktu (sekurang-kurangnya 1 minggu) setelah induksi dimana telah terjadi sensitisasi.

Sensitisasi kulit

Respon kulit terhadap suatu bahan yang berdasarkan reaksi imunologik.

Uji tantang (*challenge*)

Uji yang dilakukan untuk menilai respon hipersensitivitas sediaan uji setelah fase induksi.

Vena jugularis

Pembuluh darah balik besar yang terdapat di leher.

BAB V
PENUTUP

Dengan disusunnya Pedoman Uji Toksisitas Praktlinik secara In Vivo ini, diharapkan dapat menjamin keamanan obat dan makanan, serta memberikan kepastian hukum bagi pelaku usaha dan lembaga penelitian/riset dalam melakukan Uji Toksisitas Praktlinik secara In Vivo, mendorong pengembangan produk baru dalam rangka penyediaan obat dan makanan yang aman bagi masyarakat.

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

ttd.

PENNY K. LUKITO