Masukan dapat kami terima paling lambat tanggal
15 November 2024
Pemberian Masukan dapat dilakukan melalui link
http://bit.ly/Masukan-Toksisitas2024

PERATURAN BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
NOMOR ... TAHUN ...

TENTANG

PEDOMAN UJI TOKSISITAS PRAKLINIK SECARA IN VIVO

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

Menimbang : a. bahwa untuk memastikan keamanan pemaparan suatu bahan atau produk pada manusia, perlu dilakukan uji toksisitas praklinik secara in vivo;

b. bahwa Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 10 Tahun 2022 tentang Pedoman Uji Toksisitas Praklinik secara In Vivo sudah tidak sesuai dengan kebutuhan hukum serta perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi sehingga perlu diganti;

c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a dan huruf b, serta untuk melaksanakan ketentuan dalam Pasal 125, Pasal 126, dan Pasal 127 Peraturan Pemerintah Nomor 5 Tahun 2021 tentang Penyelenggaraan Perizinan Berusaha Berbasis Risiko, perlu menetapkan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan tentang Pedoman Uji Toksisitas Praklinik secara In Vivo;

Mengingat : 1. Peraturan Pemerintah Nomor 5 Tahun 2021 tentang Penyelenggaraan Perizinan Berusaha Berbasis Risiko (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2021 Nomor 15);

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

3. Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 21 Tahun 2020 tentang Organisasi dan Tata Kerja Badan Pengawas Obat dan Makanan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2020 Nomor 1002) sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 13 Tahun 2022 tentang Perubahan atas 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 2022 Nomor 629);

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 Bahan Alam adalah bahan, ramuan bahan, atau produk yang berasal dari sumber daya alam berupa tumbuhan, hewan, jasad renik, mineral, atau bahan lain dari sumber daya alam, atau campuran dari bahan tersebut yang telah digunakan secara turun temurun, atau sudah dibuktikan berkhasiat, aman, dan bermutu, digunakan untuk pemeliharaan kesehatan, peningkatan kesehatan, pencegahan penyakit, pengobatan, dan/atau pemulihan kesehatan berdasarkan pembuktian secara empiris dan/atau ilmiah.
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. Kosmetik 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 memastikan keamanan obat dan makanan.

(2) Obat dan makanan sebagaimana dimaksud pada ayat (1) meliputi produk:
   a. Obat;
   b. Obat Bahan Alam;
   c. Obat Kuasi;
   d. Suplemen Kesehatan;
   e. Kosmetik; 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 Bahan Alam, 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.

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; dan
   b. pelaku usaha di bidang obat dan makanan dan/atau lembaga penelitian/riset sesuai dengan ketentuan

peraturan perundang-undangan dalam mengajukan persetujuan pelaksanaan uji praklinik untuk Uji Toksisitas dan/atau menyampaikan data toksisitas untuk mendukung aspek keamanan 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 teratogenisitas;
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;
11. uji karsinogenisitas; dan
12. uji toksisitas inhalasi.

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 dan/atau lembaga penelitian/riset 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

Persetujuan pelaksanaan uji praklinik untuk Uji Toksisitas dan/atau data toksisitas yang telah diajukan sebelum berlakunya Peraturan Badan ini, tetap diproses berdasarkan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 10

Tahun 2022 tentang Pedoman Uji Toksisitas Praklinik secara In Vivo.

Pasal 6

Pada saat Peraturan Badan ini mulai berlaku, Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 10 Tahun 2022 tentang Pedoman Uji Toksisitas Praklinik secara In Vivo (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2022 Nomor 490), 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

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

TARUNA IKRAR

Diundangkan di Jakarta
pada tanggal

PLT. DIREKTUR JENDERAL
PERATURAN PERUNDANG-UNDANGAN
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
REPUBLIK INDONESIA,

ASEP N. MULYANA

BERITA NEGARA REPUBLIK INDONESIA TAHUN NOMOR

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

BAB I
PENDAHULUAN

Bahaya akibat pajanan 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, toksisitas inhalasi, 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 pajanan 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, toksisitas inhalasi, dan uji karsinogenisitas.

Pedoman ini disusun dengan tujuan agar dapat digunakan sebagai pedoman uji toksisitas praklinik dalam pengembangan Obat baru, Obat Bahan Alam, 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 Bahan Alam, 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 Praklinik 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. Dioperasionalkan 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 celullose*) 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 bahan alam, pembuatan sediaan uji simplisia tanaman obat bahan alam 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 pakan

Pada uji toksisitas dengan pemberian berulang seperti pada uji toksisitas subkronis, dengan pertimbangan kepraktisan, sediaan uji dapat diberikan dengan mencampur dalam pakan dan minum hewan uji. Namun harus diperhatikan bahwa dosis yang diberikan harus tetap dan sesuai untuk setiap hewan uji, dosis berdasarkan berat badan dan perhitungan jumlah pakan dan minum 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 LD_{50} 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 pajanan 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 kronis oral, umur hewan uji disesuaikan dengan penjabaran pada Uji Toksisitas Kronis Oral pada Bab III. Semua hewan uji yang digunakan untuk pengujian dilaporkan pada akhir uji toksisitas.

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° ± 3° 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

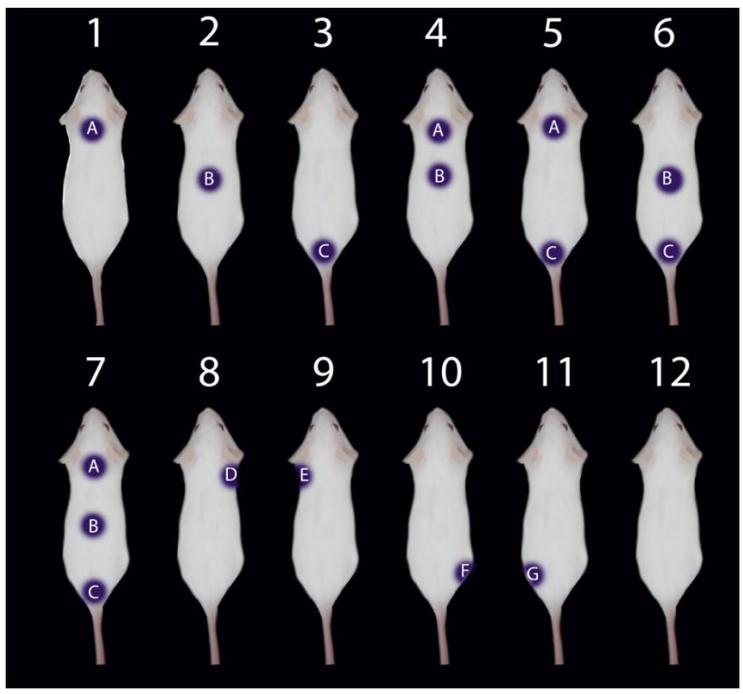
Sebelum perlakuan hewan uji diaklimatisasi terlebih dahulu selama 5-7 hari.

Hewan dapat ditempatkan secara individu atau dikandangkan dalam kelompok kecil dengan jenis kelamin yang sama. Namun pengandangan secara individu harus didasari justifikasi ilmiah. Untuk pengandangan akut, 24 jam pertama setelah pemberian sediaan uji dikandangkan secara individual untuk dilakukan pengamatan secara intensif dan setelah 24 jam di kelompokkan sesuai dosis.

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.



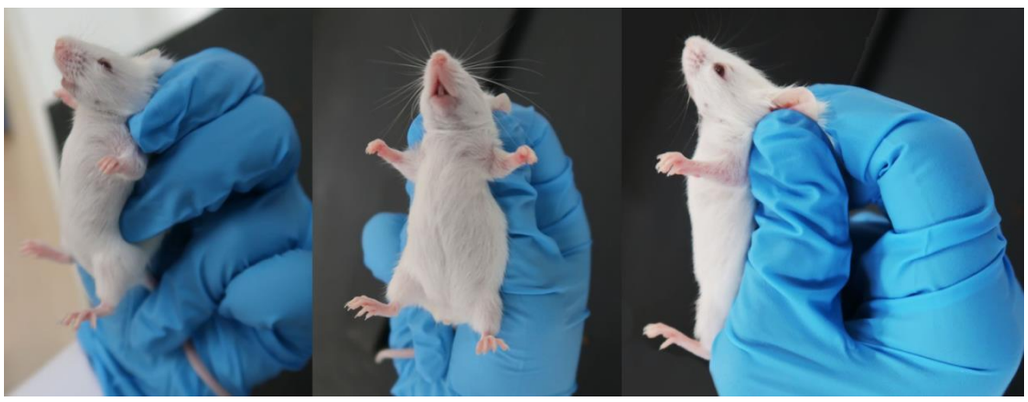
Gambar 1. Tempat penandaan hewan uji pada beberapa bagian tubuh hewan
(sumber: foto koleksi Balai Pengujian Produk Biologi, PPPOMN, Badan POM)

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 ke dalam 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

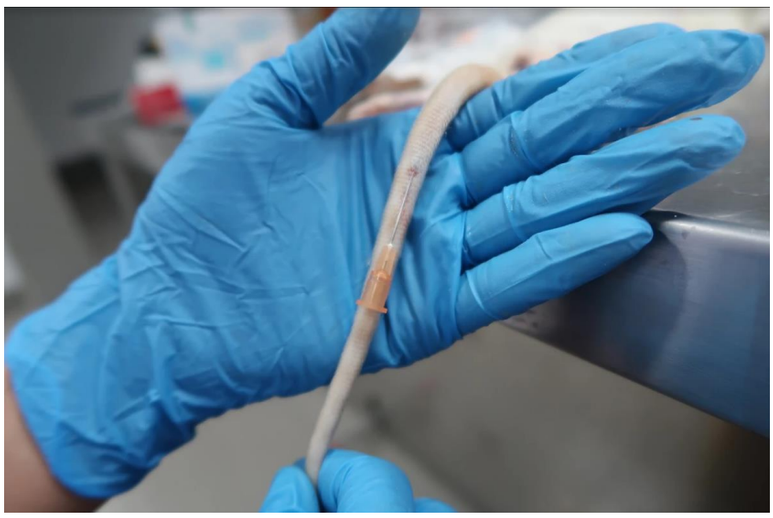
1. Pengambilan Darah Hewan Uji

   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.

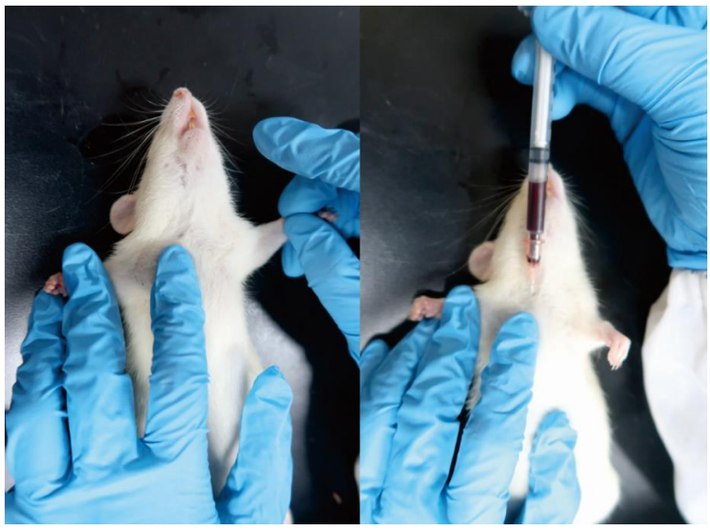


Gambar 6. Pengambilan darah mencit di mata

(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.



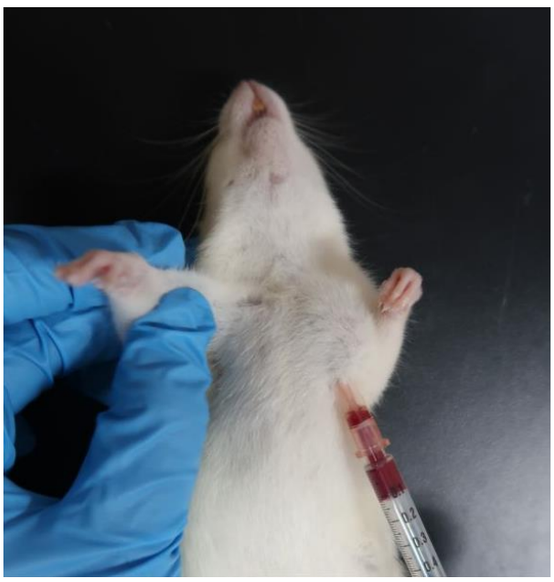
Gambar 7. Pengambilan darah tikus di vena jugularis

(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

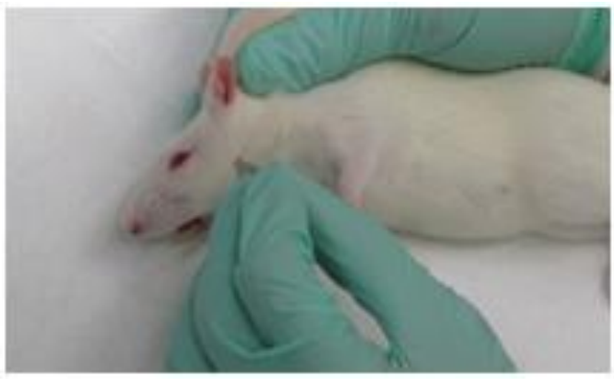
Koleksi dari rute ini dapat dilakukan dalam kondisi hewan terbius maupun tidak, sepanjang hewan dikendalikan (*restrained*) dengan baik dan kaki belakang dapat diakses dengan leluasa. Darah dapat dikoleksi dari vena saphena lateral yang terletak agak di dorsal kaki belakang lalu menyilang lateral di atas persendian tarsal. Kaki belakang perlu ditahan lalu sedikit ditarik agar posisi ekstensi. Bagian kaki tepat diatas 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 lancet 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*) dimasukan 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 (Na_2EDTA, K_2EDTA atau K_3EDTA) 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 (10^6/mm^3)	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 (10^3/mm^3)	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 (10^3/mm^3)	-	-

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 (10^6/mm^3)	6,8 – 8,5 (M) 7,0 – 8,2 (F)	7,0 – 9,8 (M) 6,5 – 9,2 (F)	7,0 – 9,6 (M) 6,5 – 8,8 (F)	7,0 – 9,2 (M) 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 (10^3/mm^3)	6,0 – 18,0 (M) 4,0 – 14,0 (F)	6,0 – 19,0 (M) 5,0 – 14,0 (F)	6,0 – 18,0 (M) 4,0 – 11,0 (F)	5,0 – 15,0 (M) 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 (10^3/mm^3)	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 (10^6/mm^3)	5 - 10
Hematokrit (%)	35 - 57
Hemoglobin (g/dl)	11 - 19
Jumlah leukosit (10^3/mm^3)	3 - 17
MCH (pg)	18 - 23
MCHC (g/dl)	31 - 40
MCV (fl)	46 - 65
Methemoglobin (% Hb)	-
Jumlah platelet (10^3/mm^3)	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 (10^6/mm^3)	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 (10^3/mm^3)	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 (10^3/mm^3)	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 distres 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 CO_2 (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 sistematik. 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 pajanan 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 pajanan 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 pajanan suatu zat secara akut, memperoleh informasi

awal yang dapat digunakan untuk menetapkan tingkat dosis, merancang uji toksisitas selanjutnya, memperoleh nilai LD_{50} 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.

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 menunjukan 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	5/*unclassified*

*) 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 Bahan Alam, 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	LD_{50} 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.

Untuk membuktikan suatu obat bahan alam dan suplemen kesehatan dalam kategori praktis tidak toksik, maka harus dikerjakan sampai dosis 5000 mg/kg.

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 LD_{50} 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 kesejahteraan hewan. 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 LD_{50} yang signifikan akibat perbedaan jenis kelamin, tetapi pada keadaan yang berbeda nilai LD_{50} 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* LD_{50} 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 LD_{50} 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 kesejahteraan hewan, bila akan menggunakan dosis diatas 5000 mg/kg berat badan, dipertimbangkan bahwa dosis tersebut sangat relevan dengan kepentingan untuk melindungi manusia, hewan atau lingkungan. Pada uji untuk obat bahan alam diperlukan uji batas hingga dosis 5000 mg/kg berat badan untuk memastikan/membuktikan bahwa obat bahan alam dan suplemen kesehatan tersebut termasuk kategori “Tidak Toksik”.

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 bahan alam diperlukan uji batas hingga dosis 5000 mg/kg berat badan.

3.a.2.7. Pengamatan

Hewan uji diobservasi secara individual dan pengamatan dilakukan pada menit ke-30, jam ke-1, jam ke-2 dan jam ke-4 setelah pemberian produk uji lalu dilakukan pengamatan setelah 24 jam dan dilanjutkan setiap hari selama 14 hari. Namun, durasi pengamatan dapat 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. Berat badan dan perubahannya;
   b. Tabulasi dari data respon dan tingkat dosis setiap hewan (yaitu: waktu hewan mulai menunjukkan gejala toksisitas termasuk kematian, keparahan dan progresifitasnya, durasi efek, dan reversibilitas).
   c. Berat badan individual hewan pada hari dipaparkan, dihitung pula dengan interval tiap minggu, serta pada waktu kematian atau saat dikorbankan;
   d. Hasil nekropsi dan histopatologi tiap hewan, bila diperlukan;

e. Data LD_{50};
f. Hasil statistik (deskripsi metode komputasi dan tabulasi dalam bentuk *spreadsheet* yang digunakan).

4. Pembahasan
5. Kesimpulan dan saran
6. Daftar Pustaka

3.b. *ACUTE TOXIC CLASS METHOD*

Metode ini tidak ditujukan untuk menghitung nilai pasti LD_{50} tetapi untuk penentuan rentang pajanan dimana kematian diperkirakan terjadi karena proporsi kematian hewan masih merupakan *endpoint* utama dari penelitian ini. Metode ini memungkinkan penentuan nilai LD_{50} 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 LD_{50} oral atau dermal pada rentang 2000 – 5000 mg/kg berat badan atau dosis yang ekivalen 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 LD_{50} 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 LD_{50} 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 bahan alam diperlukan uji batas hingga dosis 5000 mg/kg berat badan.

3.b.2.6. Pengamatan

Hewan uji diobservasi secara individual dan pengamatan dilakukan pada menit ke-30, jam ke-1, jam ke-2 dan jam ke-4 setelah pemberian produk uji lalu dilakukan pengamatan setelah 24 jam dan dilanjutkan setiap hari selama 14 hari. Namun, durasi pengamatan dapat diperpanjang tergantung dari reaksi toksik dan waktu *onse*t 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 (alumunium, 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. Berat badan dan perubahannya;
   b. Tabulasi dari data respon dan tingkat dosis setiap hewan (yaitu: waktu hewan mulai menunjukkan gejala toksisitas termasuk

kematian, keparahan dan progresifitasnya, durasi efek, dan reversibilitas).

c. Berat badan individual hewan pada hari dipaparkan, dihitung pula dengan interval tiap minggu, serta pada waktu kematian atau saat dikorbankan;
d. Hasil nekropsi dan histopatologi tiap hewan, bila diperlukan;
e. Data LD50;
f. Hasil statistik (deskripsi metode komputasi dan tabulasi dalam bentuk *spreadsheet* yang digunakan).

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 LD_{50}. 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 LD_{50} 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. LD_{50} 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 bahan alam diperlukan uji batas hingga dosis 5000 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 LD_{50}. 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. LD_{50} 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. LD_{50} 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. LD_{50} 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

<u>Uji Batas pada 5000 mg/kg berat badan</u>

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 LD_{50}. Bila hewan dapat bertahan hidup maka diberikan dua hewan uji tambahan, bila kedua hewan bertahan hidup, LD_{50} 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. LD_{50} 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. LD_{50} 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 Bahan Alam 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 LD_{50} dan kemiringan kurva dosis-respon.

Hewan pertama diberikan sediaan uji dengan dosis dibawah dosis estimasi LD_{50}. 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 LD_{50} dan kemiringan, kriteria (3) akan terpenuhi dengan 4 sampai 6 hewan setelah pengujian *reversal*. Bila telah memenuhi kriteria penghentian maka nilai estimasi LD_{50} 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 LD_{50} 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 dan pengamatan dilakukan pada menit ke-30, jam ke-1, jam ke-2 dan jam ke-4 setelah pemberian produk uji lalu dilakukan pengamatan setelah 24 jam dan dilanjutkan setiap hari selama 14 hari. Namun durasi pengamatan dapat diperpanjang tergantung dari reaksi toksik dan waktu *onse*t 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 LD_{50} untuk Uji Utama

Nilai LD_{50} 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:

$$L = L_1 L_2 \ldots\ldots L_n$$

Keterangan :

L merupakan *likehood* 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) - μ] / σ
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 marjinal. 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*, pakan 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 pajanan;
   d. Detail dari kualitas pakan dan minum (termasuk tupe/sumber pakan, sumber air).
5. Hasil
   a. Berat badan dan perubahannya;
   b. Tabulasi dari data respon dan tingkat dosis setiap hewan (yaitu: waktu hewan mulai menunjukkan gejala toksisitas termasuk kematian, keparahan dan progresifitasnya, durasi efek, dan reversibilitas);
   c. Berat badan individual hewan pada hari dipaparkan, dihitung pula dengan interval tiap minggu, serta pada waktu kematian atau saat dikorbankan;
   d. Hasil nekropsi dan histopatologi tiap hewan, bila diperlukan;
   e. Data LD_{50};
   f. Hasil statistik (deskripsi metode komputasi dan tabulasi dalam bentuk *spreadsheet* yang digunakan).
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*. Khusus untuk obat bahan alam tidak diperlukan kelompok interim. 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 pajanan 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 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 dan histopatologi.

2. TUJUAN

Untuk memperoleh informasi adanya:

1. Efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut.
2. Efek toksik setelah pajanan 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 pajanan 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 bahan alam.

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;

Untuk obat bahan alam, jumlah hewan uji yang digunakan dapat mengacu pada Bab IV huruf J.

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. Jika dosis pemakaian lebih dari 1000 mg/kg bb, maka pengujian dilakukan sesuai dengan dosis pemakaian.

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 pajanan 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 Pakan

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 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^{0}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 K dan L atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

3.a.1.11. Pemeriksaan Biokimia Klinis

Pemeriksaan biokiomia 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 M – BB atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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 dikorbankan 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 CC atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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 (alumunium, 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 pakan 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.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;

Untuk obat bahan alam, jumlah hewan uji yang digunakan dapat mengacu pada Bab IV huruf J.

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 pajanan 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 Pakan

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^{0}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 sahih.

3.b.1.11. Pemeriksaan Biokimia Klinis

Pemeriksaan biokiomia 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 M- BB atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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 CC atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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. Pengambilan keputusan hasil evaluasi selalu dibandingkan dengan kelompok kontrol.

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 (alumunium, 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 seminggu) dan pakan 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 dan dibandingkan dengan kelompok kontrol

5. Pembahasan
6. Kesimpulan

   Untuk hasil hematologi dan biokimia klinis perlu dilakukan analisis statistik terhadap kelompok kontrol dan dibandingkan/dibahas terhadap nilai normal berbasis referensi.
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 20 ekor hewan yang terdiri dari 10 ekor hewan jantan dan 10 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.

Untuk obat bahan alam, jumlah hewan uji yang digunakan dapat mengacu pada Bab IV huruf J.

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 pajanan 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 Pakan

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 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 (±30°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^{0}C) 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 K dan L atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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 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 M- BB atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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. Untuk pemeriksaan histopatologi lebih lanjut (dengan tujuan tertentu) maka organ kelompok yang tidak dilakukan pemeriksaan histopatologi disimpan dalam bentuk organ atau preparat histologi.

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

Pemeriksaaan 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 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*, kelanjar 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 CC atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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 pakan 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.

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 bahan alam, dan bahan lain yang penggunaannya berulang dalam jangka waktu lebih dari 4 minggu. Khusus untuk obat bahan alam yang digunakan secara klinis lebih dari 1 bulan sampai 6 bulan dilakukan pengujian uji toksisitas kronis selama 6 bulan, sedangkan penggunaan secara klinis lebih dari 6 bulan dilakukan pengujian toksisitas kronis 9 sampai 12 bulan.

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.
   Khusus untuk obat bahan alam dengan pemakaian pada manusia lebih dari 6 bulan tidak perlu melalui uji toksisitas subkronis dan dapat langsung melakukan uji toksisitas kronis.
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.

Jika diperlukan uji karsinogenisitas, maka 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;
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 40 ekor hewan yang terdiri dari 20 ekor hewan jantan dan 20 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 bahan alam dan suplemen kesehatan, kelompok *interim* tetap 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.

Untuk obat bahan alam, jumlah hewan uji yang digunakan dapat mengacu pada Bab IV huruf J.

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 pajanan 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 Pakan

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 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 diferensial leukosit. Sisanya dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar (±30°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^{0}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 K dan L atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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 dipuasakan 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 M- BB atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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.l. 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

Pemeriksaaan histopatologi dilakukan pada:

a. Semua hewan pada kelompok kontrol dan kelompok dosis tertinggi.
b. Hewan yang sekarat (moribound) dan mati selama periode pengujian.
c. Hewan dari kelompok lainnya dengan kelainan makroskopik yang menunjukkan adanya lesi kasar dan kelainan lainnya misalnya terjadi perubahan indeks organ dan kelainan hasil pemeriksaan laboratorium fungsi organ dan hematologi.
d. Jaringan target, atau jaringan yang menunjukkan perubahan yang berkaitan dengan perlakuan pada kelompok dosis tinggi dibandingkan semua hewan di semua kelompok dosis lainnya.
e. Dalam kasus organ berpasangan seperti ginjal, adrenal, kedua organ harus diperiksa.

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]
coagulating gland (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, *turbinate* dan sinus paranasal]	kulit	[ureter]
mata (termasuk retina)	kerongkongan	sumsum tulang belakang (*cervical, mid-thoracic* dan *lumbar*)	[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 CC atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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 (alumunium, 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 pakan 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 bunting 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 kebuntingan hingga hari pembedahan. Sesaat sebelum pembedahan, 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 (jaringan lunak 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 pajanan prenatal pada hewan uji yang bunting 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 galur 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, 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, disesuaikan dengan jenis hewan, sebagai contoh untuk tikus dapat 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 pakan 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 pakan laboratorium diketahui meningkatkan berat badan pada rodensia. Sebagai panduan, jumlah fitoestrogen pada pakan hewan tidak boleh melebihi 350 µg setara ekivalensi genistein/gram pakan.

3.b. Jumlah Hewan Uji

Setiap kelompok uji dan kontrol harus memiliki jumlah hewan yang cukup untuk menghasilkan kira-kira 20 ekor hewan betina bunting di nekropsi. Kelompok yang kurang dari 16 ekor hewan betina bunting mungkin tidak

memenuhi untuk studi. Kematian hewan betina bunting 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 absorbsi, distribusi, metabolisme dan retensi atau ekskresi dari sediaan uji. Pembawa yang digunakan tidak boleh toksik dan mempengaruhi reproduksi.

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 hari pada saat yang lebih kurang sama waktunya.

Hewan sehat ditempatkan sesuai dengan kelompoknya. Pengelompokan hewan setidaknya terdiri dari 3 kelompok dosis dan 1 kelompok kontrol yang diuji bersamaan. Tingkat dosis harus diberi jarak untuk menghasilkan gradasi efek toksik. Dosis sediaan uji yang paling tinggi harus menimbulkan efek toksik (tanda klinis atau penurunan berat badan) tetapi tidak menimbulkan kematian atau gejala toksisitas yang berat; dosis menengah menghasilkan efek toksik minimal yang dapat diamati; sedangkan dosis yang paling rendah tidak menimbulkan toksisitas baik pada induk maupun perkembangan fetus. Dosis efektif/dosis lazim harus masuk dalam salah satu kelompok dosis uji. Tingkatan dosis yang menurun harus dipilih untuk menunjukkan respon dosis dengan *no observed adverse effect level* (NOAEL). Tingkatan dosis dapat menggunakan kelipatan 2 atau 4 sehingga diperoleh interval yang tidak terlalu lebar. Jika terdapat interval yang sangat lebar, maka dapat ditambahkan kelompok dosis uji keempat.

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.

Hewan pada kelompok kontrol diberi pelarut/ pembawa yang sesuai pada sediaan uji dengan cara pemberian yang sama dengan hewan kelompok uji.

Volume pemberian sediaan uji secara oral 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 0,4 mL/100 g berat badan. Variasi volume pemberian sediaan uji harus dihindari, konsentrasi sediaan uji diatur sedemikian rupa agar volume pemberian konstan.

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 pajanan 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 pajanan 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 DD atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih. 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 EE atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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 FF atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.
d. Umumnya pemberian sediaan uji diberikan setiap hari dari implantasi (misal hari ke-5 paska kawin) sampai ke hari sebelum pembedahan. Jika dari studi pendahuluan (bila tersedia) tidak menunjukkan potensi yang tinggi untuk kehilangan praimplantasi, pemberian sediaan uji dapat diperpanjang dengan mencakup seluruh periode kebuntingan, dari kawin hingga sehari sebelum jadwal hewan dikorbankan. Umumnya penanganan hewan (handling) atau stres yang tidak tepat selama kebuntingan 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 pakan 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 GG atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih. 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 HH atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih dan diperiksa terhadap kelainan kerangka dengan cara seperti yang tertera sesuai dengan penilaian kerangka fetus tikus sebagaimana tercantum dalam Bab IV huruf II atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih. 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 JJ atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih. Untuk kelinci, setiap fetus hidup digunakan untuk pemeriksaan jaringan lunak dan kerangka.

Observasi

a. Pengamatan: 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 pakan

- 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 bunting dan tidak bunting tidak boleh digabungkan.
- Konsumsi pakan 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 dikorbankan dan menjalani pemeriksaan makroskopik menyeluruh.
- Pada saat penghentian atau kematian selama studi, induk 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 pembedahan 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 uteri

- Segera setelah penghentian atau setelah kematian, uteri harus diangkat dan status kebuntingan hewan dipastikan. Uteri yang tampak tidak bunting 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 bunting .
- 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. 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 bunting tidak boleh dikumpulkan dengan induk yang bunting.
- Sebagai pilihan, hormon lain dapat diukur jika relevan.
- Untuk kendali mutu, diusulkan agar data kendali historis dikumpulkan dan koefisien variasi dihitung untuk analit, 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 menunjukan 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 pajanan 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 pakan dan minum.
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 pajanan oral berulang terhadap suatu zat selama kebuntingan. 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 uji tantang (*challenge test)*.

Untuk produk obat bahan alam, obat kuasi dan kosmetik dengan penggunaan topikal yang sudah diketahui keamanan bahan-bahannya dan tujuan penggunaan berdasarkan kajian risiko maka tidak diperlukan Uji Sensitisasi Kulit.

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 uji tantang (*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.

3.1. 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.

3.2. 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

uji tantang, 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

<u>Fase Induksi Intradermal (Hari ke-0)</u>

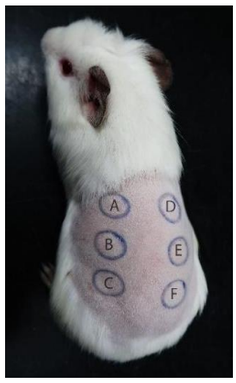
Induksi intradermal: bahan-bahan berikut ini disuntikan secara intradermal di bagian bahu/*scapular* masing-masing marmut.

- 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.* Pajanan 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*. Pajanan 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 udema 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. Untuk meyakinkan hasil pengamatan sudah benar, dianjurkan untuk diamati oleh 2 orang peneliti.

3.h. Evaluasi Hasil

Menurut *Magnusson* and *Kligman* bila hasil uji sensitisasi mempunyai skor ≥ 1 maka dikategorikan sebagai sediaan yang bersifat *sensitisizer*, 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 uji tantang (*rechallenge*) yang dilakukan 1 sampai 2 minggu setelah uji tantang yang pertama. Uji tantang kedua (*rechallenge*) disarankan menggunakan kelompok kontrol baru. Prosedur pengujian yang digunakan sama seperti uji tantang 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 *sensitisizer* ringan sampai sedang seperti *hexylcinnamic aldehyde, mercapto*

benzothiazole dan *benzocaine.*

4. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan uji harus memuat informasi berikut:

1. Deskripsi dan cara pajanan 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 uji tantang, jumlah total sediaan uji yang digunakan pada induksi dan uji tantang.
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 pajanan 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	▪ 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: i. Derajat Opasitas kornea ≥ 3 dan/ atau ii. Iritis > 1,5; *Dihitung berdasarkan skor rata-rata penilaian pada 24, 48 dan 72 jam setelah pemberian senyawa uji*
Kategori 2 Efek reversibel ▪ 2 A /Iritan	Setidaknya 2 dari 3 hewan yang diuji memberikan respon positif: ▪ Derajat opasitas kornea ≥1 dan/atau ▪ Iritis ≥ 1 dan/atau ▪ Kemerahan konjungtiva ≥2 dan/atau ▪ Udema konjungtiva (kemosis) ≥ 2
▪ 2 B /Iritan ringan	Setidaknya 2 dari 3 hewan yang diuji memberikan respon positif dan efek yang dituliskan dibawah secara penuh bersifat refersibel dalam waktu 7 hari pengamatan: ▪ Derajat opasitas kornea ≥1 dan/atau ▪ Iritis ≥ 1 dan/atau ▪ Kemerahan konjungtiva ≥2 dan/atau ▪ Udema konjungtiva (kemosis) ≥ 2 *Dihitung berdasarkan skor rata-rata penilaian pada 24, 48 dan 72 jam setelah pemberian senyawa uji*

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 (pH ≤ 2) atau basa kuat (pH ≥ 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 menunjukan 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 Anastetik 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 subtitusi.

- 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^{o}C selama 72 ± 2 jam atau dengan autoklaf pada suhu 121^{0}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 cm2 (kedua sisi)	Potongan $\pm$ 5 x 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 x 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 x 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 *(conjungtival 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 pajanan 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 pajanan 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 pajanan 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 niktitans. 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 *nacrous*; bagian iris tidak terlihat; ukuran pupil hampir tidak dapat dibedakan.....	3
Kornea gelap; iris tidak kelihatan.....	4
Iris	
Normal	0
Rugae terlihat jelas dan dalam, penyumbatan, pembengkakan *circumcorneal hyperaemia,* 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 pajanan sediaan uji pada dermal sampai 4 jam. Prinsip uji iritasi/ korosi akut dermal adalah pajanan 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 (pH ≤ 2 atau ≥ 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	**Subkategori korosif**	**Korosif pada ≥ 1 dari 3 hewan**	
(digunakan bila tidak menggunakan subkategori		**Pajanan**	**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 ≥ 2,3 sampai ≤ 4,0 pada minimal 2 dari 3 hewan pada jam ke 24, 48 dan 72 setelah tambalan dilepaskan, atau bila reaksi terlambat, setelah pajanan pengamatan selama 3 hari berturut-turut; atau ii. Inflamasi tidak sembuh sampai hari ke 14 minimal pada 2 ekor hewan uji, terjadi *alopecia* pada daerah tertentu, *hyperplasia*, *scaling* atau iii. Pada beberapa kasus ketika terdapat variabilitas respon yang jelas di hewan, dengan terdapat efek positif yang sangat pasti berkaitan dengan pajanan sediaan uji di hewan tunggal tapi dengan kriteria yang luring dari kriteria diatas		
Kategori 3, Iritan ringan	Skor rata-rata untuk eritema/udema ≥ 1,5 sampai ≤ 2,3 pada jam ke 24, 48 dan 72, atau bila reaksi terlambat, setelah pajanan, 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 (*negligible)*
0,5 – 1,9	Iritan ringan *(slight)*
2,0 – 4,9	Iritan sedang *(moderate)*
5,0 – 8,0	Iritan kuat *(severe)*

(ISO 10993-10, 2010)

Untuk produk obat bahan alam, obat kuasi dan kosmetik dengan penggunaan topikal yang sudah diketahui keamanan bahan-bahannya dan tujuan penggunaan berdasarkan kajian risiko maka tidak diperlukan Uji Iritasi/Korosi

Akut Dermal.

1. PRINSIP

Prinsip uji iritasi/ korosi akut dermal adalah pajanan 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 pajanan 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 galur 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

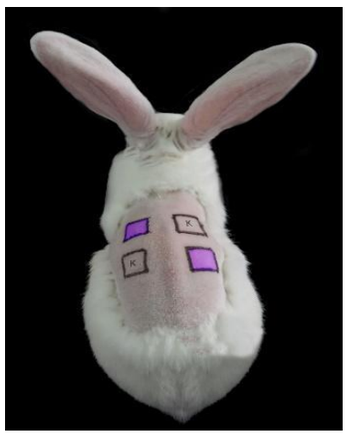
Dosis yang digunakan untuk sediaan uji cair adalah sebanyak 0,5 mL dan untuk sediaan uji padat atau semi padat sebanyak 0,5 g.

3.c. Cara Pemberian Sediaan Uji

Sediaan uji dipaparkan di area kulit seluas ± 6 (2 x 3) cm^2 dengan lokasi pajanan seperti yang terlihat pada Gambar 12, kemudian lokasi pajanan ditutup dengan kasa dan diplester dengan plester yang bersifat non-iritan. Plester harus dibuat longgar menggunakan balutan semi-oklusif yang sesuai selama periode pajanan. Bila sediaan uji/bahan uji diaplikasikan ke plester, plester harus menempel pada kulit sedemikian rupa sehingga ada kontak yang baik dan distribusi bahan uji yangs 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 pajanan, (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 pajanan 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 pajanan, 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 pajanan 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 pajanan, maka uji dihentikan. Bila efek korosif tidak teramati hingga pajanan 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. Untuk meyakinkan hasil pengamatan sudah benar, dianjurkan untuk diamati oleh 2 orang peneliti.

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 *eschar* 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 pajanan oleh sediaan uji).....	4

(OECD, 2015)

3.g. Analisis Data

Hasil pengamatan dirangkum dalam bentuk tabel yang memperlihat 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 udema seluruh titik pengamatan sampel pada jam ke 24, 48 dan 72 dibagi jumlah pengamatan

B : Jumlah skor eritema dan udema 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 udema dibuat dalam bentuk tabel;
   b. Deskripsi dari luka akibat pajanan 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 pajanan dengan selang waktu antar pajanan (24 ± 2) jam. Selama pajanan, jaringan mukosa vagina diamati dan diberi skor terhadap kemungkinan adanya eritema, eksudat dan udema. Setelah selesai pajanan 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 pH ≤ 2 atau ≥ 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 pajanan dengan selang waktu antar pajanan (24 ± 2) jam. Selama pajanan , jaringan mukosa vagina diamati dan diberi skor terhadap kemungkinan adanya eritema, eksudat dan udema. Setelah selesai pajanan 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 (pH ≤ 2) atau basa kuat (pH ≥ 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 menunjukan 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 ^{o}C selama 72 ± 2 jam atau dengan autoklaf pada suhu 121^{0}C selama 60 menit. Kemudian ekstrak didekantasi dan disimpan pada suhu kamar (30 ^{0}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 pajanan 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 pajanan 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 udema. Bila ditemui adanya eritema, eksudat dan udema 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 udema yang parah meskipun waktu pengujian (5 hari) belum tercapai. Bila tidak ditemukan eritema, eksudat dan udema 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 CC atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih. 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, *flatting*	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 *(none)*
1 – 4	Iritan sangat ringan *(minimal)*
5 – 8	Iritan ringan *(mild)*
9 – 11	Iritan sedang *(moderate)*
12 – 16	Iritan kuat (*severe)*

(ISO 10993-10:2010)

Indeks iritasi dihitung dengan rumus berikut:

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 udema 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 pajanan 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 pajanan 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 LD_{50} suatu zat, penentuan penggolongan zat, menetapkan informasi pada label dan informasi absorbsi pada kulit.

Uji toksisitas akut dermal menggunakan hewan percobaan diperlukan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah

pajanan suatu sediaan uji dalam sekali pemberian melalui rute dermal. Hasil toksisitas akut dermal dievaluasi seperti pada evaluasi uji toksisitas akut oral. Untuk produk obat bahan alam, obat kuasi dan kosmetik dengan penggunaan topikal yang sudah diketahui keamanan bahan-bahannya dan tujuan penggunaan berdasarkan kajian risiko maka tidak diperlukan Uji Toksisitas Akut Dermal.

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 KK dan LL. 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 pajanan 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 LD_{50} suatu zat, penentuan penggolongan zat, menetapkan informasi pada label dan informasi absorbsi 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 pajanan 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 pajanan 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 pajanan ditutup dengan kasa berpori dan dibalut dengan perban elastis serta plester yang tidak mengiritasi selama 24 jam. Setelah selesai periode pajanan, 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 KK. 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 LL.

3.g. Pengamatan

a. Periode pengamatan; dilakukan selama tidak kurang dari 14 hari. Namun lamanya pengamatan tersebut dapat diperpanjang sesuai reaksi yang timbul akibat pajanan sediaan uji. Hewan diamati segera setelah perlakuan pada waktu ke-30 menit, 2 jam, 4 jam, 6 jam dan 24 jam pertama serta setiap hari sekali selama 14 hari.

b. Penilaian klinis; dilakukan secara individual terhadap adanya perubahan pada kulit, bulu, mata, membran mukosa, sistem pernafasan, sistem peredaran darah, sistem saraf otonom, sistem saraf pusat, aktivitas somatomotor, dan pola tingkah laku. Adanya gejala-gejala toksisitas lainnya seperti gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, tertidur dan koma, waktu kematian dicatat seteliti mungkin.

   Gejala toksik dapat diamati dengan adanya iritasi kulit yang ditunjukkan oleh adanya edema dan eritema menurut Kriteria *Draize* (1944) pada Tabel 24.

   Tabel 24. Sistem Penilaian Iritasi Dermal Menggunakan Draize (1944)

Eritema dan *Eschar*	Nilai	Edema	Nilai
Tanpa Eritema	0	Tanpa edema	0
Sangat Sedikit Eritema	1	Sangat Sedikit Edema	1
Eritema Jelas	2	Sedikit Edema (tepi area terlihat menonjol dan jelas)	2
Eritema Sedang hingga Parah	3	Edema Sedang (penonjolan sekitar 1 mm)	3
Eritema Parah (kemerahan) sedikit, eschar (perlukaan dalam)	4	Edema Parah (penonjolan lebih dari 1 mm dan melebihi batasan area pajanan)	4

   Untuk meyakinkan hasil pengamatan sudah benar, dianjurkan untuk diamati oleh 2 orang peneliti.

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 terhadap semua hewan yang hidup termasuk hewan yang mati selama pengujian atau dikeluarkan dari penelitian karena alasan kesejahteraan hewan. Pemeriksaan secara mikroskopik dilakukan terhadap organ yang menunjukkan adanya perubahan secara makro dan pada tempat pengobatan. Sedangkan pemeriksaan mikroskopik hewan yang bertahan 24 jam atau lebih setelah pemberian dosis awal dapat dipertimbangkan.

3.h. Pengumpulan dan Analisis Data

3.h.1. Pengumpulan Data

Data yang harus dikumpulkan adalah waktu kematian masing-masing hewan, deskripsi dan jangka waktu efek toksik serta reversibilitasnya, dan temuan nekropsi.

3.h.2. Analisis Data

Nilai LD_{50} 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 LD_{50}.

3.i. Interpretasi hasil

Pengujian toksisitas akut dengan rute dermal (perkutan) dan penentuan LD_{50} dermal dapat menunjukkan perkiraan toksisitas relatif dari bahan uji. Perkiraan hasil uji toksisitas dermal akut dan nilai LD_{50} 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, pakan, data historis dll;

   e. Detail dari pakan dan minum (termasuk tipe dan sumber pakan , 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 pajanan;

   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 pajanan sediaan uji melalui kulit secara berulang dalam jangka waktu tertentu, mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas setelah pajanan sediaan uji melalui kulit secara berulang dalam jangka waktu tertentu.

Untuk produk obat bahan alam, obat kuasi dan kosmetik dengan penggunaan topikal yang sudah diketahui keamanan bahan-bahannya dan tujuan penggunaan berdasarkan kajian risiko maka tidak diperlukan Uji Toksisitas Subkronis Dermal.

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 pajanan 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 pajanan 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. Khusus untuk obat bahan alam tidak diperlukan kelompok interim. 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. Khusus untuk obat bahan alam tidak diperlukan kelompok interim. 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 pajanan 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 sedian 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 pajanan, 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 dapat diamati dengan adanya iritasi kulit yang ditunjukkan oleh adanya edema dan eritema menurut Kriteria *Draize* (1944) pada Tabel 25.

Tabel 25. Sistem Penilaian Iritasi Dermal Menggunakan Draize (1944)

Eritema dan *Eschar*	Nilai	Edema	Nilai
Tanpa Eritema	0	Tanpa edema	0
Sangat Sedikit Eritema	1	Sangat Sedikit Edema	1
Eritema Jelas	2	Sedikit Edema (tepi area terlihat menonjol dan jelas)	2
Eritema Sedang hingga Parah	3	Edema Sedang (penonjolan sekitar 1 mm)	3
Eritema Parah (kemerahan) sedikit, eschar (perlukaan dalam)	4	Edema Parah (penonjolan lebih dari 1 mm dan melebihi batasan area pajanan)	4

Untuk meyakinkan hasil pengamatan sudah benar, dianjurkan untuk diamati oleh 2 orang peneliti.

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 pajanan 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 (±30°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^{0}C) untuk pemeriksaan biokimia klinis.

4.l. 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 K dan L atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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 M-BB atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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 serebelar dan korteks sereblar), 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 CC atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

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 pakan 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.
   j. Penilaian kriteria Draize, bila dilakukan; dan prosedur interpretasi data.
5. Pembahasan
6. Kesimpulan
7. Daftar Pustaka

K. UJI KARSINOGENISITAS

Uji karsionogenisitas 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 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 pajanan 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 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 pajanan manusia dosis rendah; penyediaan data untuk menguji hipotesis mengenai mekanisme kerja.

Uji karsinogenisitas memberikan informasi tentang kemungkinan bahaya kesehatan yang mungkin muncul dari pajanan 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 pajanan 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 pajanan 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 keterpajanan 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° ± 3°C, dengan kelembaban relatif 30–70% atau diatur sebesar 50-60%, dan penerangan 12 jam terang 12 jam gelap. Ruangan harus selalu dijaga kebersihannya. Hewan diberi pakan yang sesuai standar laboratorium dan diberikan tanpa batas (*ad libitum*).

Pakan harus memenuhi semua persyaratan nutrisi dari spesies yang diuji dan kandungan kontaminan pakan 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 pakan 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 pakan mungkin dipengaruhi oleh kebutuhan untuk memastikan campuran yang sesuai dari sediaan uji ketika sediaan uji diberikan melalui pakan.

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 absorbsi, 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 pakan (yang sesuai) pada kondisi pemberian (misalnya, pemberian melalui pakan).

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 pakan, dan menyebabkan asupan pakan berkurang secara signifikan karena berkurangnya palatabilitas pakan, 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 pakan 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 pajanan pada manusia. Sediaan harus diberikan setiap kali pada saat yang lebih kurang sama waktunya. Uji karsinogenisitas melibatkan pajanan melalui rute dermal atau inhalasi mungkin juga diperlukan untuk penilaian risiko kesehatan manusia dan/atau mungkin diperlukan dalam hal regulasi tertentu, kedua rute pajanan 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 pajanan manusia (misalnya obat-obatan). Untuk bahan kimia pakan atau lingkungan termasuk pestisida, pemberian biasanya melalui pakan atau air minum. Namun, untuk beberapa skenario, misalnya, pajanan 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 sitotoksisitas 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 pajanan 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 ± 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. Pajanan melalui rute inhalasi dilakukan selama 6 jam per hari, 7 hari per minggu, tetapi pajanan selama 5 hari per minggu juga dapat digunakan, jika didasari justifikasi. Periode pajanan biasanya akan berlangsung selama 24 bulan. Jika spesies hewan rodensia selain tikus hanya dipaparkan pada hidung saja, durasi maksimum pajanan dapat disesuaikan untuk meminimalkan cekaman/distres pada spesies tersebut. Diperlukan justifikasi apabila durasi pajanan 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 mekanistis 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 sahih.

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 26. Jaringan yang diawetkan dalam uji karsinogenisitas

Semua lesi kasar	Jantung	Pankreas	Lambung (*forestomach, glandular stomach*)
Kelenjar adrenal	Ileum	Kalenjar 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, turbinate 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 menunjukan jumlah hewan pada awal pengujian; jumlah hewan yang mati selama pengujian atau dikorbankan 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 pengelompokkan 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 pakan dan minum
4. Hasil pengujian
   a. Umum
      - Data survival;
      - Berat badan/perubahan berat badan;

- Konsumsi pakan, perhitungan efisiensi pakan, jika ada, dan konsumsi minum, 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.

L. UJI TOKSISITAS INHALASI

1. PRINSIP

Uji toksisitas inhalasi merupakan cara yang tepat untuk mengkarakterisasi bahaya/efek yang merugikan dari sediaan uji pada pemajanan secara inhalasi. Uji toksisitas inhalasi dapat tidak dilakukan jika:

a. Terdapat sedikit atau secara signifikan tidak ada pajanan inhalasi sediaan uji pada manusia saat diproduksi, dipasarkan atau digunakan
b. Sediaan uji memiliki volatilitas rendah dan tidak bersifat aerosol dalam kondisi penggunaan
c. Sediaan uji berukuran terlalu besar untuk dihirup (misalnya butiran tidak rapuh) atau tahan terhadap gesekan (misalnya penggilingan)
d. Aerosol pada produk akhir (*end-use product*) atau metode aplikasi yang dipertimbangkan tidak dapat terhirup dengan > 99% massa partikel berdiameter > 100 μm pada pajanan manusia
e. Sediaan uji tidak dapat dihasilkan sebagai gas, uap, atau aerosol dalam konsentrasi yang cukup untuk menimbulkan ketoksikan pada hewan dalam kondisi optimal pada bejana inhalasi.

2. TUJUAN

Tujuan uji toksisitas inhalasi adalah untuk memperoleh informasi adanya kemungkinan bahaya yang timbul setelah pemajanan suatu zat melalui rute inhalasi.

3. PERTIMBANGAN KHUSUS

a. Sebelum mempertimbangkan melakukan uji toksisitas inhalasi, diperlukan informasi lengkap mengenai sediaan uji dan metode alternatif yang dapat dipilih untuk meniadakan atau meminimalkan pengujian pada hewan.
b. Informasi yang diperlukan untuk membantu proses seleksi hewan uji (jenis, galur, jenis kelamin hewan) dan metode uji serta konsentrasi pengujian adalah
    1) Bahan uji: identitas, sifat fisiko-kimia
    2) Bentuk sediaan (gas/uap/aerosol)

3) Hasil uji toksisitas in vitro atau in vivo yang telah tersedia sebelumnya.
4) Antisipasi penggunaan bahan uji

c. Pertimbangan etik untuk memenuhi kesejahteraan hewan pada uji toksisitas inhalasi meliputi penggunaaan metode untuk meminimalkan stres dan penderitaan hewan. Penggunaan titik akhir studi yang tidak mematikan pada konsentrasi rendah di kurva respon memiliki manfaat serupa dengan menggunakan titik akhir berupa kematian. Jika tujuan uji dapat dicapai dengan menggunakan metode alternatif yang melibatkan jumlah hewan yang lebih sedikit, maka metode tersebut sebaiknya dipilih.
d. Beberapa upaya implementasi kesejahteraan hewan antara lain adalah menerapkan titik akhir mengorbankan hewan secara manusiawi untuk meminimalkan penderitaan hewan, pelaksanaan *sighting study* (uji pendahuluan) untuk meminimalkan jumlah hewan, dan penggunaan metode lebih terkini seperti uji *Acute Toxic Class Method* dan *Fixed Concentration Procedure* untuk meminimalkan jumlah hewan.
e. Jika hewan menunjukkan gejala distress dan nyeri yang berat, maka sebaiknya dikorbankan secara manusiawi. Jika sediaan uji diketahui merupakan korosif dan menimbulkan iritasi, konsentrasi target sebaiknya bukan yang akan menimbulkan efek tersebut namun tetap mampu memenuhi tingkat kurva konsentrasi dan respon yang dapat memenuhi tujuan uji, baik dari sisi regulasi maupun ilmiah.
f. Uji hanya dapat dilakukan menggunakan bejana khusus untuk uji toksisitas inhalasi yang memenuhi ketentuan yang diatur pada pedoman bagian Bejana Inhalasi (4.c.1.2., 4.c.2.2., 4.c.3.2 dan 5.c.4)
g. Pemilihan bejana (*whole body* atau *nose-only*) perlu mempertimbangkan keuntungan dan kerugian setiap metode, termasuk beberapa hal pada tabel berikut. Penggunaan bejana *whole body* lebih mendukung kesejahteraan hewan karena penggunaan *nose-only* memiliki risiko menimbulkan stress pada hewan akibat pengendalian fisik, pembatasan pakan dan minum, akumulasi panas dan risiko sesak napas jika hewan membalikkan badannya.

Tabel 27. Keuntungan dan Kerugian dari Metode Pajanan (Sumber: Wong, 2007)

Metode pajanan	Keuntungan	Kerugian
Whole Body	• Metode pajanan yang lebih "natural" • Hewan tidak direstrain • Sangat efisien untuk jumlah hewan yang banyak • Sangat efisien untuk studi yang lama • Hewan dapat dipelihara di dalam bejana	• Rute pajanan yang tidak dikehendaki seperti rute oral (bahan uji dapat tertelan/terjilat ketika *grooming*) dan rute dermal (bahan uji dapat terserap melalui kulit) • Memerlukan sirkulasi udara yang baik • Menggunakan bahan yang banyak • Tidak efisien jika hanya menggunakan hewan dalam jumlah sedikit • Hewan membutuhkan aklimatisasi dalam kandang kawat • Ekskreta dapat berinteraksi dengan polutan
Head/Nose Only	• Mengurangi pajanan dari rute lain • Menggunakan bahan yang lebih sedikit • Lebih mudah dibersihkan dan berisi bahan uji • Memindahkan hewan di tengah pajanan tanpa mengganggu hewan lain • Sesuai untuk penelitian dosis berulang	• Restrain pada hewan dapat menyebabkan stress • Tidak ada makan dan minum selama pajanan • Kemungkinan adanya peningkatan suhu ruang • Kemungkinan hewan mencoba untuk berputar yang menyebabkan sesak • Hewan bekerja secara intensif

h. Penggunaan bejana *nose-only* memerlukan pengendalian hewan menggunakan perangkat yang membatasi fisik hewan (restraining tube). Perangkat tersebut sedapat mungkin tidak menimbulkan stress akibat

pembatasan fisik, suhu dan imobilisasi. Feses dan urin harus dapat keluar langsung dari perangkat selama pajanan berlangsung.

i. Sehubungan dengan penggunaan bejana *nose-only*, pertimbangan dari komisi etik dalam pemilihan metode pembatasan fisik hewan berkepanjangan (*prolonged restraint*) dapat mengacu pada *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* yang menitikberatkan pada penggunaan metode alternatif, meminimalkan durasi pembatasan fisik, kemungkinan diperlukan habituasi terhadap perangkat pembatas, diperlukan observasi dengan frekuensi dan interval waktu yang memadai, pembatasan pemberian pakan dan air minum (*food and fluid restriction*), dan penetapan serta pengambilan keputusan pengorbanan hewan lebih dini secara manusiawi (*humane endpoint*).

j. Penggunaan bejana *whole-body* untuk pemajanan sebaiknya dilakukan pada hewan yang dikandangkan secara individu untuk menghindari kemungkinan aliran napas hewan dibatasi bulu hewan yang posisinya berdekatan.

4. MONITORING KONDISI PAJANAN

a. Aliran Udara Bejana

Aliran udara pada bejana inhalasi harus dikontrol dan dipantau terus menerus serta dicatat setidaknya setiap jam selama pemajanan. Monitoring atmosfer konsentrasi uji secara *real time* merupakan pengukuran integral dari semua parameter dinamis dan secara tidak langsung merupakan cara untuk mengontrol semua parameter inhalasi dinamis yang relevan. Perhatian khusus harus diberikan untuk menghindari inhalasi ulang pada bejana melalui hidung. Konsentrasi oksigen minimal 19% dan konsentrasi karbon dioksida tidak boleh melebihi 1%. Jika terdapat kondisi dimana standar ini tidak dapat dipenuhi maka konsentrasi oksigen dan karbon dioksida harus diukur. Pengukuran pemajanan gas-gas dilakukan sejak hari pertama hingga akhir uji.

b. Suhu dan Kelembaban Relatif Bejana

Suhu dalam bejana harus dijaga pada 22 ± 3 °C. Kelembaban relatif pada zona inhalasi hewan, baik pada bejana hidung maupun seluruh tubuh, harus dipantau dan dicatat setiap jam selama setiap pajanan jika

memungkinkan. Kelembaban relatif idealnya harus dijaga dalam kisaran 30 - 70%, tetapi hal ini mungkin tidak dapat dicapai jika pengujian dilakukan pada formulasi berbasis air atau tidak dapat diukur karena pengaruh senyawa kimia pada sediaan uji dengan metode pengujian.

c. Sediaan Uji: Konsentrasi Nominal

Konsentrasi nominal adalah massa sediaan uji yang dihasilkan dibagi dengan volume total udara yang melewati sistem bejana inhalasi. Jika memungkinkan, konsentrasi nominal pada bejana inhalasi harus dihitung dan dicatat. Konsentrasi nominal tidak digunakan untuk mengkarakterisasi pajanan pada hewan, tetapi perbandingan antara konsentrasi nominal dan konsentrasi aktual pada toksisitas akut inhalasi atau konsentrasi nominal dan konsentrasi analitik pada toksisitas subkronis inhalasi dapat memberikan indikasi efisiensi dari sistem pengujian.

d. Sediaan Uji: Konsentrasi Aktual pada Toksisitas Akut Inhalasi

Konsentrasi aktual adalah konsentrasi sediaan uji pada zona inhalasi hewan dalam bejana inhalasi. Konsentrasi aktual diperoleh dengan metode tertentu (misalnya pengambilan sampel langsung, metode adsorptif atau reaktif kimiawi, dan karakterisasi *subsequent analytical*) atau dengan metode nonspesifik seperti analisis filter gravimetri.

Penggunaan analisis gravimetri hanya dapat diterima untuk aerosol powder komponen tunggal atau aerosol dengan cairan volatilitas rendah dan harus didukung oleh pra-studi karakterisasi spesifik sediaan uji yang sesuai. Konsentrasi aerosol powder multi-komponen juga dapat ditentukan dengan analisis gravimetri. Akan tetapi, hal ini membutuhkan data analitik yang menunjukkan bahwa komposisi bahan di udara mirip dengan bahan awal. Jika informasi ini tidak tersedia maka analisis ulang sediaan uji (idealnya dalam keadaan terbawa udara) secara berkala selama pengujian mungkin diperlukan. Untuk agen aerosol yang dapat menguap atau menyublim, harus ditunjukkan bahwa semua fase dikumpulkan dengan metode yang dipilih. Konsentrasi target, nominal, dan aktual harus dilaporkan dalam hasil pengujian, tetapi hanya konsentrasi aktual yang digunakan dalam analisis statistik untuk menghitung nilai konsentrasi yang mematikan.

Kondisi atmosfer pada saat pemajanan harus dijaga agar tetap konstan dan dipantau terus menerus tergantung pada metode analisis. Ketika pengukuran kondisi atmosfer dilakukan berselang, sampel kondisi atmosfer bejana sediaan uji harus diambil setidaknya 2 (dua) kali dalam pengujian selama 4 (empat) jam. Jika tidak memungkinkan karena kecepatan aliran udara yang terbatas atau konsentrasi yang rendah maka 1 (satu) sampel dapat dikumpulkan selama periode pemajanan. Sampel konsentrasi bejana individu tidak boleh menyimpang dari konsentrasi rata-rata ± 10% untuk gas dan uap atau ± 20% untuk aerosol cair atau padat. Waktu untuk ekuilibrasi bejana (t_{95}) harus dihitung dan dicatat.

e. Sediaan Uji: Konsentrasi Analitik pada Toksisitas Subkronis Inhalasi

Konsentrasi analitik adalah konsentrasi sediaan uji pada zona inhalasi hewan dalam bejana inhalasi. Konsentrasi analitik diperoleh dengan metode tertentu (misalnya pengambilan sampel langsung, metode adsorptif atau reaktif kimiawi, dan karakterisasi *subsequent analytical*) atau dengan metode non-spesifik seperti analisis filter gravimetri.

Kondisi atmosfer pada saat pemajanan harus dijaga agar tetap konstan dan harus diukur setidaknya 3 sampel selama pajanan pada setiap tingkat konsentrasi. Perangkat pemantauan *real time*, seperti fotometer aerosol untuk aerosol, atau analiser hidrokarbon total untuk uap, dapat digunakan untuk menunjukkkan stabilitas kondisi pemajanan. Jika pengukuran tidak memungkinkan karena kecepatan aliran udara yang terbatas atau konsentrasi yang rendah maka pengukuran dapat dilakukan pada 1 (satu) sampel selama pajanan. Sampel konsentrasi individu tidak boleh menyimpang dari konsentrasi rata-rata ± 10% untuk gas dan uap atau ± 20% untuk aerosol cair atau padat. Waktu untuk mencapai kesetimbangan bejana (t_{95}) harus dihitung dan dicatat. Durasi pemajanan mencakup waktu penyiapan sediaan uji.

f. Sediaan Uji: Distribusi Ukuran Partikel Aerosol pada Toksisitas Akut Inhalasi

Distribusi ukuran partikel aerosol harus ditentukan setidaknya 2 (dua) kali selama durasi pajanan 4 jam dengan menggunakan *cascade impactor* atau instrumen alternatif seperti pengukur partikel aerodinamis. Jika kesetaraan hasil yang diperoleh oleh *cascade impactor*

atau instrumen alternatif dapat ditunjukkan, maka instrumen alternatif dapat digunakan selama pengujian. Peralatan kedua, seperti filter gravimetri atau *impinger*/gelembung gas, harus digunakan secara paralel dengan instrumen utama untuk memastikan efisiensi pengumpulan instrumen utama. Konsentrasi massa yang diperoleh dengan analisis ukuran partikel harus dalam batas yang wajar dari konsentrasi massa yang diperoleh dengan analisis filter. Jika kesetaraan dapat ditunjukkan pada awal tahap pengujian, maka pengukuran konfirmasi lebih lanjut dapat dihilangkan. Untuk alasan kesejahteraan hewan, langkah-langkah harus diambil untuk meminimalkan data yang tidak meyakinkan yang dapat menyebabkan perlunya pengulangan pajanan. Pengukuran partikel harus dilakukan untuk uap jika ada kemungkinan kondensasi uap dapat mengakibatkan pembentukan aerosol, atau jika partikel terdeteksi dalam atmosfer uap dengan potensi fasa campuran.

g. Sediaan Uji: Distribusi Ukuran Partikel Aerosol pada Toksisitas Subkronis Inhalasi

Untuk memastikan pajanan yang cukup pada saluran pernapasan bagian bawah, jika memungkinkan aerosol harus memenuhi standar: *Mass Median Aerodynamic Diameter* (MMAD) ≤ 2 μm dengan deviasi standar geometris (σg atau GSD) sebesar 1-3 untuk tikus. Pengukuran ukuran partikel harus dilakukan untuk uap yang dapat mengembun dan membentuk aerosol. Model deposisi dapat digunakan untuk memperkirakan berapa banyak atau berapa fraksi aerosol yang mencapai bagian tertentu dari saluran pernapasan. Hal ini juga dapat didukung dengan data beban paru setelah pajanan.

Distribusi ukuran partikel halus aerosol setidaknya diperiksa setiap minggu pada tiap tingkatan konsentrasi dengan menggunakan *cascade impactor* atau instrumen alternatif seperti pengukur partikel (diameter setara termodinamika atau optik). Jika kesetaraan hasil yang diperoleh oleh *cascade impactor* dan instrumen alternatif dapat ditunjukkan, maka instrumen alternatif dapat digunakan selama pengujian.

Pemeriksaan jumlah partikel dan distribusi ukuran untuk pajanan aerosol non-*fibrous* dan isometrik nanomaterial lebih disarankan dengan pemindaian pengukur partikel mobilitas, penganalisa mobilitas

diferensial, atau pengukur partikel aerodinamis. *Micro-orifice uniform-deposit impactors* dapat digunakan untuk semua bahan termasuk bahan berserat (*fibrous*) untuk menentukan konsentrasi pajanan dalam hal distribusi massa dan ukuran. Setidaknya dua metode berbeda harus digunakan untuk menentukan pajanan partikel kuantitatif (yaitu jumlah partikel, distribusi ukuran, atau massa partikel).

5. METODE UJI TOKSISITAS AKUT INHALASI

5.a. PRINSIP

Uji toksisitas akut inhalasi adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek merugikan yang disebabkan oleh sediaan uji yang ada di udara setelah pajanan tunggal tanpa gangguan secara inhalasi selama kurang dari 24 jam. Pada umumnya uji toksisitas akut inhalasi berdurasi 4 jam. Berdasarkan peninjauan berkala dengan mempertimbangkan perkembangan ilmu pengetahuan dan kesejahteraan hewan OECD mengadopsi beberapa panduan tes untuk uji toksisitas akut inhalasi yaitu:

a. TG 433 – *Fixed Dose Method,* menggunakan lebih sedikit hewan daripada TG 403, untuk menentukan LC_{50} yang disimpulkan atau diduga *(an inferred* LC_{50}*)* (diadopsi pada 2017)
b. TG 436 - *Acute Toxic Class* (ATC), menggunakan lebih sedikit hewan daripada TG 403 dengan menerapkan prosedur bertahap dan konsentrasi target tetap untuk menentukan peringkat toksisitas bahan dalam klasifikasi dan pelabelan menurut *Globally Harmonized System* (GHS), serta menentukan perkiraan kisaran LC_{50} (diadopsi pada 2009).
c. TG 403 yang direvisi, mencakup 2 (dua) protokol yaitu protokol tradisional dan protokol C × t (diadopsi pada tahun 2009).

   Kedua protokol tersebut memberikan fleksibilitas dalam menggambarkan hubungan konsentrasi-kematian sehingga dapat memenuhi berbagai kebutuhan regulasi. Tujuan uji toksisitas akut inhalasi pada pedoman TG 403 adalah untuk mendapatkan hubungan konsentrasi-respon mulai dari konsentrasi yang menghasilkan respon tidak mematikan hingga mematikan untuk mendapatkan nilai tengah konsentrasi mematikan (yaitu, LC_{50}),

konsentrasi ambang batas tidak mematikan (misalnya, LC_{01}), dan kemiringan (*slope*). Jika nilai tetap perkiraan letalitas diperlukan (misalnya, LC_{50} 4 jam) maka dipilih protokol tradisional sedangkan jika diperlukan perkiraan pengaruh waktu pada konsentrasi dan informasi nilai LC_{10} atau LC_{01} maka digunakan protokol C × t.

Sekelompok hewan uji dengan jenis kelamin yang sama diberikan.

5.b. TUJUAN

Tujuan uji toksisitas akut inhalasi adalah untuk:

a. memperoleh informasi adanya kemungkinan bahaya yang timbul setelah pemajanan suatu zat melalui rute inhalasi secara akut;
b. untuk memperoleh informasi awal yang dapat digunakan dalam menetapkan tingkat konsentrasi dan merancang uji toksisitas selanjutnya; untuk menetapkan nilai LC_{50}, LC10, LC01 dan kemiringan (*slope*) suatu bahan serta penentuan klasifikasi dan pelabelan bahan/sediaan, salah satunya menurut *Globally Harmonized System* (GHS).

5.c. PROSEDUR

5.c.1. *FIXED DOSE METHOD*

Metode ini hanya menggunakan konsentrasi toksik yang sedang sehingga toksisitas yang sudah terlihat nyata (*evident toxicity*) digunakan sebagai titik akhir sebagai alternatif dari titik akhir berupa kematian/ kondisi hampir mati (*moribund*) dan menghindari penggunaan konsentrasi letal.

Selain itu, konsentrasi yang diperkirakan menyebabkan nyeri dan sakit yang nyata karena tindakan korosif atau iritan parah, juga tidak boleh diberikan. Hewan kondisi hampir mati (*moribund*), atau hewan yang mengalami nyeri atau menunjukkan tanda-tanda kesakitan yang parah dan berkepanjangan harus dikorbankan secara manusiawi, dan dipertimbangkan dalam interpretasi hasil pengujian dengan cara yang sama seperti hewan yang mati dalam pengujian.

Sekelompok hewan dari satu jenis kelamin dipajankan sediaan uji dalam waktu yang singkat dalam prosedur bertahap menggunakan konsentrasi tetap (*fixed concentration*) yang sesuai, yaitu:

a. untuk uap (vapour): 0,5; 2; 10 dan 20 mg/l
b. untuk debu/kabut (aerosol): 0,05; 0,5; 1 dan 5 mg/l
c. untuk gas: 100; 500; 2500 dan 20.000 ppm

Tingkat konsentrasi awal dipilih berdasarkan informasi yang tersedia atau uji pendahuluan pada konsentrasi yang diharapkan menimbulkan toksisitas yang nyata (*evident toxicity*), tanda-tanda toksisitas yang jelas tanpa menyebabkan efek toksik yang parah atau kematian, yang memprediksi pajanan pada konsentrasi tertinggi berikutnya akan menyebabkan toksisitas yang parah atau kematian/ kondisi hampir mati pada sebagian besar hewan. Toksisitas yang nyata (*evident toxicity)* terjadi sebelum tanda dan kondisi klinis yang terkait dengan nyeri, penderitaan, dan kematian. Kelompok hewan selanjutnya dapat diuji pada konsentrasi yang lebih tinggi tanpa adanya tanda-tanda toksisitas yang nyata (*evident toxicity*) atau kematian pada konsentrasi yang lebih rendah.

Prosedur uji dilanjutkan sampai diperoleh:

a. Kematian/kondisi hewan yang hampir mati pada konsentrasi terendah; atau
b. ditemukan tidak lebih dari 1 (satu) kematian atau kondisi hewan yang hampir mati (*moribund*); atau
c. konsentrasi yang menimbulkan toksisitas yang nyata (kematian); atau
d. tidak ada efek toksik yang terlihat pada konsentrasi tertinggi

Tergantung pada hasil pengujian (yaitu toksisitas yang nyata (kematian) maka pengujian pada satu tingkat konsentrasi mungkin cukup untuk menilai toksisitas akut dari sediaan uji. Toksisitas yang nyata (*evident toxicity*) didefinisikan sebagai tanda-tanda toksisitas yang jelas setelah pemberian sediaan uji, sehingga dapat diperkirakan bahwa dengan pemberian konsentrasi yang lebih tinggi akan menyebabkan kondisi nyeri yang hebat, hampir mati (*moribund*), kematian pada sebagian besar hewan. Tanda-tanda toksisitas yang dimaksud adalah jika 1 (satu) atau lebih hewan menunjukkan salah satu gejala antara lain tremor, hipoaktivitas, pernapasan tidak teratur atau penurunan berat badan (> 10% dari berat badan sebelum pengujian) sejak mulai dipanjankan. Analisis juga mencakup informasi

tentang tanda lain yang jarang teramati namun diprediksi kuat akan muncul.

Pedoman ini sebaiknya digunakan berdasarkan pengalaman dan justifikasi peneliti.

5.c.1.1. Penyiapan Hewan Uji

Kriteria hewan uji yang digunakan sama dengan kriteria hewan uji pada uji toksisitas akut inhalasi metode lain. Hewan uji rodensial yaitu tikus (galur Sprague Dawley atau Wistar) lebih dipilih atau jika menggunakan spesies lain maka harus disertai dengan justifikasi. Penggunaan jenis kelamin hewan dalam uji utama ditentukan dari uji pendahuluan atau berdasarkan informasi yang tersedia (bila ada). Jika tidak ada perbedaan yang nyata dalam hal kerentanan jenis kelamin maka digunakan hewan jantan. Hewan betina hanya digunakan jika terbukti lebih rentan dari hewan jantan.

5.c.1.2. Bejana Inhalasi

Hewan uji dipaparkan sediaan uji yang berupa gas, uap, aerosol, atau campurannya. Kondisi fisik pengujian tergantung pada sifat fisika-kimia dari sediaan uji, konsentrasi yang dipilih, dan/atau bentuk fisik yang kemungkinan besar ada selama pengujian dan penggunaan sediaan uji. Teknik pemajanan dapat digunakan *head/nose-only* atau *whole-body*. Metode *head/nose-only* meminimalkan pemajanan sediaan uji melalui rute non-inhalasi dan memungkinkan pengujian masing-masing hewan pada konsentrasi tinggi, seperti yang dipersyaratkan untuk uji batas, tanpa memerlukan material dalam jumlah besar. Keuntungan lainnya meliputi; kemudahan pemeliharaan atmosfer uji yang homogen, potensi ketidakstabilan sediaan uji lebih kecil (misalnya, reaksi dengan kotoran atau kelembapan), dan keseimbangan atmosfer bejana yang lebih cepat karena volume yang dibutuhkan lebih kecil. Namun, metode *head/nose-only* memerlukan pengekangan hewan selama periode pajanan yang dapat menyebabkan stres pada hewan. Hal ini tidak terjadi pada metode *whole-body*. Model pajanan yang dipilih harus dirancang untuk meminimalkan rasa nyeri, sakit atau penderitaan pada hewan uji serta sesuai dengan tujuan ilmiah dari pengujian.

Teknik pajanan *head/nose-only*, selama pemajanan, hewan dipaparkan sediaan uji dalam tabung pemajanan. Tabung penahan hewan (*restraining tube)* tidak boleh mengakibatkan stres pada hewan uji, dan harus dikondisikan untuk menghindari terjadinya stres hipertermik dan tidak memungkinkan hewan untuk menghindari pajanan inhalasi. Namun, jika keseimbangan negatif volume udara yang disuplai dan diekstraksi tidak dapat dihindari, pengenceran atmosfer uji dengan aliran udara bias (melalui tabung pajanan) harus dicegah. Bejana inhalasi harus dioperasikan dalam tudung kepala (*hood)* yang berventilasi baik. Hewan harus diuji dengan peralatan inhalasi yang dirancang untuk mempertahankan aliran udara dinamis yang melebihi paling sedikit dua kali volume ventilasi pernapasan semua hewan di perangkat inhalasi. Harus dipastikan jika kandungan oksigen cukup yaitu minimal 19 % dan konsentrasi karbondioksida tidak melebihi 1 %, dengan kondisi pemajanan yang serupa di setiap tempat pemajanan. Selama pengambilan sampel atmosfer uji, gangguan dinamika aliran udara yang signifikan harus dihindari. Laju aliran udara harus disesuaikan untuk memastikan bahwa kondisi yang sama di seluruh peralatan.

Teknik pajanan *whole-body*, hewan harus diuji dengan menggunakan peralatan inhalasi yang dirancang dapat mempertahankan aliran udara dinamis sekitar 12 sampai 15 pergantian udara per jam atau nilai laju aliran udara lain untuk memenuhi persyaratan khusus sesuai dengan sediaan uji. Harus dipastikan jika kandungan oksigen cukup yaitu minimal 19 % dan konsentrasi karbondioksida tidak melebihi 1 %, dengan kondisi pemajanan yang serupa di setiap tempat pemajanan. Untuk memastikan stabilitas atmosfir pada bejana, volume total hewan uji tidak boleh melebihi 5 % dari volume ruang uji.

5.c.1.3. Pemberian Sediaan uji

Durasi pajanan yang tetap selama empat jam, tidak termasuk waktu ekuilibrasi. Jangka waktu lain mungkin diperlukan untuk memenuhi persyaratan khusus. Untuk menetapkan konsentrasi pajanan yang sesuai wajib dilakukan uji coba tanpa hewan. Secara

teknis sulit untuk menghasilkan atmosfer uji yang secara akurat memenuhi konsentrasi pajanan tetap yang ditentukan. Oleh karena itu, untuk mencegah pengujian berulang yang tidak perlu maka sampel konsentrasi bejana individual tidak boleh menyimpang dari konsentrasi bejana rata-rata, untuk gas dan uap tidak lebih dari ± 10% dan tidak lebih dari ± 20% untuk aerosol cair atau padat.

Karena sulit untuk memprediksi daerah paling responsif pada saluran pernapasan atau ukuran partikel yang paling berbahaya maka distribusi ukuran partikel dari debu dan aerosol harus dibuat sedemikian rupa sehingga pemajanan di semua area saluran pernapasan dapat dicapai. Sebuah aerosol dengan *mass median aerodynamic diameter* (MMAD) ≤4 μm dan deviasi standar geometris (GSD) dalam kisaran 1 hingga 3,0 direkomendasikan untuk memastikan terjadinya pajanan saluran pernapasan yang komprehensif. Jika terjadi penyimpangan dari MMAD yang direkomendasikan maka penjelasan dan justifikasi harus diberikan. Misalnya, asap logam mungkin memiliki nilai MMAD atau GSD yang lebih kecil dari yang ditetapkan, dan partikel bermuatan; fiber; serta bahan higroskopis (yang ukurannya bertambah di lingkungan saluran pernapasan yang lembab) dapat memiliki nilai MMAD atau GSD yang lebih besar.

5.c.1.4. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk memilih jenis kelamin yang paling sensitif/rentan serta memilih konsentrasi awal yang sesuai untuk uji utama. Uji pendahuluan tidak perlu dilakukan jika informasi terkait konsentrasi awal dan/atau data kerentanan jenis kelamin hewan telah tersedia. Sediaan uji diberikan kepada 2 (dua) hewan (1 jantan dan 1 betina) secara bersamaan pada konsentrasi awal yang dipilih untuk jangka waktu sekurang-kurangnya 4 (empat) jam. Pengujian dilanjutkan secara berurutan tergantung pada hasil pengujian dengan mengikuti diagram alir Bab IV huruf OO, QQ, dan SS. Jika kedua hewan menunjukkan respon kematian yang sama, toksisitas yang nyata (*evident toxicity)* yang tidak fatal atau tidak ada efek maka uji pendahuluan dihentikan dan dilanjutkan pada uji utama yang dilakukan pada hewan jantan atau

dengan 2 (dua) hewan (1 jantan dan 1 betina) pada konsentrasi berikutnya. Jika pada konsentrasi berapa pun, terdapat indikasi perbedaan kerentanan jenis kelamin maka uji utama akan dilakukan menggunakan jenis kelamin yang terbukti lebih sensitif, dan uji pendahuluan dilanjutkan dengan jenis kelamin tersebut untuk menentukan konsentrasi awal yang sesuai pada uji utama. Uji pendahuluan selesai jika konsentrasi awal untuk uji utama dapat diperoleh, berdasarkan tanda-tanda toksisitas yang nyata (*evident toxicity)* atau jika kematian/kondisi hewan hampir mati diamati pada konsentrasi tetap yang terendah. Hewan jantan harus digunakan untuk uji utama jika tidak ada perbedaan yang jelas dalam sensitivitas antar jenis kelamin.

Konsentrasi awal pada uji pendahuluan dipilih dari tingkatan *fixed concentration* dalam Bab IV huruf OO, QQ, dan SS sebagai konsentrasi yang diharapkan dapat menimbulkan toksisitas yang nyata (*evident toxicity*). Jika memungkinkan 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 konsentrasi awal ditentukan sebesar 10 mg/l untuk uap; 1 mg/l untuk aerosol; atau 2500 ppm untuk gas.

Jangka waktu untuk pengujian selanjutnya paling sedikit 24 jam dan semua hewan diamati sekurang-kurangnya selama 7 hari. Dalam kasus, bila terjadi kematian atau toksisitas yang nyata pada tingkat konsentrasi terendah dalam uji pendahuluan maka pengujian dihentikan dan sediaan uji ditetapkan masuk kategori 1 GHS tanpa perlu melakukan uji utama (seperti yang ditunjukkan pada Bab IV huruf OO, QQ, dan SS. Namun jika diperlukan konfirmasi lebih lanjut dari klasifikasi tersebut (seperti jika kematian/kondisi hewan hampir mati hanya terjadi pada 1 jenis kelamin) maka sebuah pilihan prosedur tambahan dapat dilakukan sebagai berikut: hewan tambahan dari jenis kelamin yang paling rentan diuji pada konsentrasi terendah. Jika hewan tersebut mati, maka kategori 1 GHS terkonfirmasi dan pengujian dihentikan. Jika hewan tersebut hidup maka pengujian pada konsentrasi terendah

dilanjutkan pada maksimum 3 (tiga) hewan uji tambahan. Karena akan ada risiko kematian yang tinggi maka hewan-hewan ini harus diuji secara berurutan untuk alasan kesejahteraan hewan. Interval waktu antara pajanan setiap hewan harus cukup untuk memastikan bahwa hewan uji sebelumnya kemungkinan besar akan dapat bertahan hidup. Jika terjadi kematian maka urutan pengujian dihentikan dan tidak diteruskan pada hewan uji yang lainnya. Berdasarkan Bab IV huruf OO, QQ, dan SS, maka sediaan uji masuk kategori 1 jika ada 2 atau lebih kematian/kondisi hewan sekarat (outcome A), atau kategori 2 jika ada 1 kematian/kondisi hewan sekarat (outcome B).

5.c.1.5. Uji Utama

Uji utama dilakukan dengan konsentrasi yang telah diperoleh pada uji pendahuluan. Tindakan yang harus diambil setelah pengujian pada tingkat konsentrasi awal ditunjukkan oleh diagram alir pada Bab IV huruf PP, RR, dan TT. Berdasarkan hasil dari setiap pengujian, salah satu tindakan dari 3 pilihan yang akan diambil yaitu: menghentikan uji dan menetapkan kelas klasifikasi bahaya yang sesuai; melanjutkan uji dengan konsentrasi yang lebih tinggi; atau melanjutkan uji dengan konsentrasi tetap yang lebih rendah. Tingkat konsentrasi yang menyebabkan kematian/kondisi hewan hampir mati dalam uji pendahuluan tidak akan ditinjau kembali dalam uji utama dengan alasan kesejahteraan hewan. Umumnya klasifikasi sediaan uji sudah dapat ditentukan berdasarkan hasil pengujian pada konsentrasi awal dan uji selanjutnya tidak diperlukan. Ketika pengujian pada rangkaian konsentrasi menurun dan 2-3 kematian diamati (dalam lingkup outcome A), maka untuk alasan kesejahteraan hewan, pengujian harus dihentikan dan sediaan uji diklasifikasikan menurut outcome C dari konsentrasi berikutnya dalam rangkaian tersebut.

Pada uji ini diperlukan 5 (lima) ekor hewan uji dari 1 (satu) jenis kelamin (dipilih hewan jantan kecuali jika hewan betina dianggap sebagai jenis kelamin yang lebih rentan) untuk tiap tingkatan konsentrasi, selain sepasang hewan yang digunakan dalam uji pendahuluan.

Interval waktu antara pemajanan pada setiap tingkat konsentrasi ditentukan oleh onset, durasi dan beratnya toksisitas. Pengujian pada konsentrasi berikutnya harus ditunda sampai diperoleh kepastian bahwa hewan uji tersebut dapat bertahan hidup. Umumnya direkomendasikan interval waktu selama 3-4 hari antar pajanan pada setiap tingkat konsentrasi untuk memungkinkan pengamatan toksisitas yang tertunda. Interval waktu tersebut dapat disesuaikan bila diperoleh hasil yang tampak meragukan.

5.c.1.6. Uji Batas

Uji batas umumnya dilakukan jika terdapat informasi bahwa sediaan uji diketahui hampir tidak beracun, seperti memiliki toksisitas jika digunakan di atas batas konsentrasi yang diatur. Informasi terkait toksisitas sediaan uji dapat diperoleh dari data senyawa uji/campuran/sediaan uji serupa, dengan mempertimbangkan identitas dan persentase komponen yang diketahui memiliki signifikansi toksikologis. Jika informasi terkait toksisitasnya sedikit atau tidak ada, atau sediaan uji diperkirakan beracun maka uji utama harus dilakukan.

Prosedur uji batas sama seperti dengan uji utama yaitu dengan menggunakan 5 (lima) ekor hewan uji dalam 1 (satu) jenis kelamin (dipilih hewan jantan kecuali jika hewan betina dianggap sebagai jenis kelamin yang lebih rentan) dengan konsentrasi batas yaitu 20 mg/l untuk uap; 5 mg/l untuk aerosol; atau 20.000 ppm untuk gas. Pada pengujian sediaan aerosol, uji batas bertujuan untuk mencapai ukuran partikel yang dapat terhirup (yaitu MMAD 1 - 4 μm). Hal ini dimungkinkan dengan sebagian besar sediaan uji pada konsentrasi 2 mg/l. Pengujian aerosol lebih dari 2 mg/l hanya boleh dilakukan jika ukuran partikel yang dapat terhirup dapat dicapai. Dalam beberapa kasus, seperti yang dipersyaratkan oleh beberapa otoritas regulasi, pengujian hingga GHS kategori 5 dapat dilakukan. Namun pengujian hewan dalam rentang GHS kategori 5 tidak disarankan dan hanya dipertimbangkan jika ada kemungkinan kuat bahwa hasil pengujian memiliki relevansi langsung untuk melindungi kesehatan manusia.

5.c.1.7. Pengamatan

Selama periode pajanan, hewan uji harus sering diamati. Selain itu, setelah pemajanan, pengamatan klinis yang cermat harus dilakukan setidaknya dua kali pada hari pajanan, atau lebih sering jika diindikasikan oleh respon hewan terhadap perlakuan. Setelah itu, pengamatan klinis harus dilakukan setidaknya sekali sehari selama total 14 hari. Durasi pengamatan dapat bervariasi dan diperpanjang tergantung dari gejala toksik dan waktu *onse*t serta lama periode pemulihan. Waktu muncul dan menghilangnya tanda-tanda toksisitas merupakan hal penting dan harus dicatat, terutama jika ada kecenderungan penundaan tanda-tanda toksisitas. Semua pengamatan dicatat secara sistematis dalam catatan individual yang dilakukan untuk setiap hewan. Hewan yang ditemukan dalam kondisi hampir mati dan hewan yang menunjukkan kesakitan parah harus dikorbankan secara manusiawi tanpa ditunda. Hewan uji yang dikorbankan atau ditemukan mati, waktu kematiannya harus dicatat. Jika hewan dikorbankan karena alasan kemanusiaan atau ditemukan mati maka waktu kematian harus dicatat setepat mungkin. Hewan yang membutuhkan eutanasia harus dianggap telah mati (untuk tujuan mengklasifikasikan outcome A dan hasil B).

Pengamatan tambahan diperlukan jika hewan uji menunjukkan gejala klinis toksisitas. Pengamatan yang dilakukan termasuk pada: kulit, bulu, mata, membran mukosa dan juga sistem pernafasan, sistem saraf otonom, sistem syaraf pusat, aktivitas somatomotor serta pola tingkah laku. Jika memungkinkan, perbedaan apa pun antara efek lokal dan sistemik harus diperhatikan. Jika memungkinkan, perbedaan antara efek lokal dan sistemik harus ditentukan. Selain itu, perlu juga pengamatan pada kondisi: gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, pernapasan tidak teratur, tidur, kondisi koma dan penurunan berat badan. Diperlukan kehati-hatian dalam melakukan pemeriksaan gejala klinis toksisitas bahwa kondisi awal yang buruk dan perubahan pernapasan sementara akibat prosedur pemajanan agar tidak disalahartikan sebagai toksisitas karena sediaan uji. Oleh karena itu, tanda-tanda yang diamati pada hari pemajanan harus dilakukan dengan seksama.

Sesuai dengan outcome B bahwa toksisitas yang nyata (*evident toxicity*) telah tercapai jika 1 (satu) atau lebih hewan menunjukkan salah satu dari tanda-tanda (dari hari setelah pajanan sampai seterusnya) yaitu tremor, hipoaktivitas, pernapasan tidak teratur atau penurunan berat badan (> 10 % dari berat sebelum pengujian). Data penelitian retrospektif menunjukkan bahwa jika salah satu dari tanda-tanda ini diamati pada setidaknya 1 (satu) hewan pada hari setelah pajanan maka kematian 2 (dua) atau lebih hewan hampir selalu diamati pada konsentrasi tertinggi berikutnya. Analisis juga dilakukan terhadap informasi yang berkaitan dengan tanda-tanda lain yang jarang teramati, yang juga memiliki prediktivitas tinggi dan dapat dipertimbangkan. Jika toksisitas parah (termasuk tanda-tanda yang tidak secara eksplisit disebutkan di atas) diamati pada hari pemajanan, atau kapan saja selama pengujian maka pengujian harus dihentikan dan hewan dieutanasia sebagaimana mestinya. Jika keputusan antara outcome B dan C dibuat tanpa ada kematian, dan peneliti memutuskan ada ketidakpastian apakah toksisitas yang nyata (*evident toxicity*) telah diamati (yaitu memicu outcome B), maka terdapat pilihan untuk melakukan pengujian pada konsentrasi batas yang lebih tinggi.

a. Berat Badan

Berat badan masing-masing hewan harus dicatat minimal satu kali selama periode aklimatisasi; sesaat sebelum diberikan sediaan uji (hari ke 0); dan setidaknya pada hari ke-1, 3, 7 setelah pemajanan dan setiap minggu setelahnya; serta pada saat kematian atau eutanasia jika melebihi hari ke-1. Berat badan merupakan indikator kritis dari toksisitas sehingga hewan yang menunjukkan penurunan > 10 % dibandingkan dengan berat pada hari pajanan, mengindikasikan bahwa toksisitas yang nyata (*evident toxicity*) telah tercapai. Pengukuran berat badan harus lebih sering dilakukan jika ada kekhawatiran seputar kondisi hewan. Pada akhir penelitian, hewan yang masih bertahan hidup, ditimbang dan dikorbankan secara manusiawi di akhir periode pasca pajanan.

b. Pemeriksaan Patologi

Seluruh hewan uji, termasuk yang mati selama pengujian atau yang dieutanasia dan yang dikeluarkan dari pengujian karena alasan kesejahteraan hewan harus dilakukan nekropsi. Jika nekropsi tidak dapat dilakukan segera setelah hewan mati maka hewan tersebut harus disimpan dalam lemari pendingan (tidak dibekukan) pada suhu yang cukup rendah untuk meminimalkan autolisis. Nekropsi harus dilakukan sesegera mungkin, biasanya dalam satu atau dua hari. Semua perubahan makropatologi harus dicatat untuk setiap hewan uji. Pemeriksaan mikroskopis pada organ yang menunjukkan bukti makropatologi pada hewan yang bertahan hidup 24 jam atau lebih setelah pajanan awal juga dapat dipertimbangkan karena dapat memberikan informasi yang berguna.

5.c.1.8. Pengumpulan Data dan Analisis

a. Data

Data masing-masing hewan harus tersedia. Data pengamatan klinis harus diringkas dalam bentuk tabel, menunjukkan jumlah hewan yang digunakan pada setiap kelompok uji, jumlah hewan yang menunjukkan tanda-tanda toksisitas spesifik, jumlah hewan yang ditemukan mati selama pengujian atau dikorbankan karena alasan kesejahteraan hewan, waktu kematian masing-masing hewan, gambaran dan perjalanan waktu efek toksik, reversibilitas, dan temuan nekropsi.

b. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Tinjauan Pustaka
3. Metode
   a. Hewan uji:
      - Spesies / galur yang;
      - Status mikrobiologi hewan, jika diketahui;
      - Periode aklimatisasi
      - Jumlah, umur dan jenis kelamin hewan (termasuk alasan penggunaan jenis kelamin betina daripada jantan);

- Sumber, kondisi kandang, data historis, pakan, dll.

b. Sediaan uji:
   - Sumber, nomor lot, tanggal batas penggunaan, jika tersedia;
   - Stabilitas sediaan uji, jika diketahui;
   - Kelarutan dan stabilitas sediaan uji dalam pelarut, jika diketahui;
   - Pengukuran ph, osmolalitas dan presipitasi dalam media kultur dimana sediaan uji ditambahkan.

c. Bahan mono-konstituen
   - Kondisi fisik, kelarutan air dan sifat fisikokimia tambahan yang relevan;
   - Identifikasi kimia, seperti nama iupac atau cas, nomor cas, kode *smiles* atau inchi, rumus struktur, kemurnian, identitas kimiawi dari pengotor yang sesuai dan dapat dilakukan secara praktis, dll.

d. Bahan multi-konstituen, UVCBs dan campuran
   - Karakterisasi dengan identitas kimia, *quantitative occurrence* dan sifat fisikokimia tambahan yang relevan dari konstituen.
   - Bahan pembawa
   - Justifikasi penggunaan dan pemilihan bahan pembawa (jika selain air).

e. Bejana inhalasi:
   - Gambaran bejana inhalasi termasuk dimensi dan volume;
   - Sumber dan gambaran peralatan yang digunakan untuk pajanan hewan serta pembentukan atmosfer;
   - Peralatan untuk mengukur suhu, kelembaban, ukuran partikel, dan konsentrasi aktual;
   - Sumber udara dan pengolahan udara yang disuplai/diekstraksi dan sistem yang digunakan untuk pengkondisian;
   - Metode yang digunakan untuk kalibrasi peralatan untuk memastikan atmosfer uji yang homogen;
   - Perbedaan tekanan (positif atau negatif);
   - Portsl pajanan per bejana (*nose only*); lokasi hewan dalam sistem (*whole body*);

- Homogenitas temporal/stabilitas atmosfer uji;
- Lokasi sensor suhu dan kelembaban dan pengambilan sampel atmosfer uji di dalam bejana;
- Laju aliran udara, laju aliran udara/portal pajanan (*nose only*), atau muatan hewan (*whole body*);
- Informasi tentang peralatan yang digunakan untuk mengukur oksigen dan karbon dioksida, jika ada;
- Waktu yang dibutuhkan untuk mencapai keseimbangan bejana inhalasi (t_{95})
- Jumlah perubahan volume per jam;
- Perangkat pengukur/*metering devices* (jika ada);

f. Data pajanan:
- Alasan pemilihan konsentrasi target dalam uji utama;
- Konsentrasi nominal (massa total sediaan uji yang dihasilkan ke dalam bejana inhalasi dibagi dengan volume udara yang melewati bejana tersebut);
- Konsentrasi sediaan uji yang sebenarnya/aktual dikumpulkan dari zona pernapasan hewan; untuk campuran uji yang menghasilkan bentuk fisik heterogen (gas, uap, aerosol), masing-masing dapat dianalisis secara terpisah;
- Semua konsentrasi udara harus dilaporkan dalam satuan massa (misalnya mg / L, mg / m^3, dll.); satuan volume (misalnya ppm, ppb, dll.) juga dapat dilaporkan dalam tanda kurung;
- Distribusi ukuran partikel, *mass median aerodynamic diameter* (MMAD), dan deviasi standar geometris (σg), termasuk metode penghitungannya. Analisis ukuran partikel individu harus dilaporkan;

g. Kondisi pemeliharaan hewan:
- Gambaran kondisi kandang, termasuk: jumlah (atau perubahan jumlah) hewan per kandang, bahan alas tidur, suhu lingkungan dan kelembaban relatif, fotoperiode, dan identifikasi pakan;
- Rincian kualitas pakan dan air (termasuk jenis/sumber pakan, sumber air);

- Gambaran setiap pengkondisian pre-test termasuk pakan, karantina, dan pengobatan untuk penyakit;

h. Kondisi pengujian:
   - Rincian penyiapan sediaan uji, termasuk rincian setiap prosedur yang digunakan untuk mengurangi ukuran partikel serbuk atau untuk menyiapkan larutan sediaan uji;
   - Uraian (termasuk diagram) peralatan yang digunakan untuk menghasilkan atmosfer uji dan untuk memaparkan hewan ke atmosfer uji;
   - Rincian peralatan untuk mengukur suhu, kelembaban, dan aliran udara pada bejana;
   - Rincian peralatan untuk mengumpulkan sampel dalam penentuan konsentrasi bejana dan distribusi ukuran partikel;
   - Rincian metode analisis kimia yang digunakan dan validasi metode (termasuk efisiensi perolehan kembali sediaan uji dari media sampling);
   - Rincian waktu yang dibutuhkan untuk mencapai keseimbangan konsentrasi pajanan sebelum dipaparkan pada hewan;
   - Metode randomisasi hewan untuk kelompok uji dan kelompok kontrol;
   - Rincian pakan dan kualitas air (termasuk tipe/sumber pakan, sumber air);
   - Alasan pemilihan konsentrasi awal.

4. Hasil
   a. Data suhu, kelembaban dan aliran udara
   b. Data konsentrasi nominal dan aktual pada bejana
   c. Data distribusi ukuran partikel termasuk data pengumpulan sampel analitis, distribusi ukuran partikel dan perhitungan MMAD dan σg
   d. Data respon dan tingkat konsentrasi untuk setiap hewan (yaitu hewan yang menunjukkan tanda-tanda toksisitas termasuk kematian, sifat, keparahan, waktu onset, dan durasi efek)

e. Data berat badan masing-masing hewan pada hari pajanan; dalam interval mingguan setelahnya, dan pada saat kematian atau euthanasia; tanggal dan waktu kematian jika sebelum eutanasia terjadwal, perjalanan waktu timbulnya tanda-tanda toksisitas dan apakah gejala ini dapat disembuhkan untuk setiap hewan
f. Data berat organ, makropatologi dan temuan histopatologi, jika ada

5. Pembahasan
6. Diskusi dan Interpretasi Hasil
   Jika ada ketidakpastian, apakah toksisitas yang nyata (*evident toxicity*) telah diamati dan diperlukan penilaian untuk mencapai hasil, maka hal ini harus dijelaskan secara lengkap. Justifikasi harus diberikan jika pengujian tambahan dilakukan.
7. Kesimpulan
8. Daftar Pustaka

5.c.2. *ACUTE TOXIC CLASS METHOD*

Metode ini digunakan untuk menentukan peringkat toksisitas sediaan uji dalam klasifikasi dan pelabelan menurut sistem *Globally Harmonized System* (GHS). Konsentrasi yang diperkirakan menyebabkan rasa sakit dan nyeri yang parah, akibat sifat korosif atau iritan parah, tidak boleh diuji dengan pedoman tes ini.

Pengujian dilakukan dengan prosedur bertahap, informasi yang cukup yang diperoleh pada toksisitas inhalasi akut sediaan uji selama periode pajanan 4 jam dapat digunakan untuk klasifikasi toksisitas sediaan uji. Durasi pemajanan selain 4 jam dapat dilakukan untuk tujuan pengaturan tertentu. Pada salah satu tahap konsentrasi yang ditentukan, 3 hewan dari setiap jenis kelamin diuji. Dua tahap konsentrasi kemungkinan cukup untuk menentukan toksisitas akut sediaan uji dengan melihat kematian dan/atau kondisi hewan yang hampir mati Jika terdapat bukti bahwa salah satu jenis kelamin lebih rentan maka pengujian dapat dilanjutkan hanya dengan jenis kelamin yang lebih rentan. Hasil dari tahap pengujian sebelumnya akan menentukan tahap berikut, yaitu:

a. Tidak perlu dilakukan pengujian lebih lanjut,
b. Pengujian dilakukan pada 3 (tiga) hewan per jenis kelamin, atau
c. Pengujian dengan 6 (enam) hewan dari jenis kelamin yang lebih rentan saja, yaitu perkiraan batas bawah dari kelas toksik didasarkan pada 6 hewan per kelompok konsentrasi uji, tanpa memandang jenis kelamin.

Hewan yang hampir mati atau hewan yang mengalami kesakitan atau menunjukkan tanda-tanda keparahan dan berkepanjangan harus dikorbankan secara manusiawi, dan dipertimbangkan dalam interpretasi hasil pengujian dengan cara yang sama seperti hewan yang mati dalam pengujian. Uji toksisitas akut inhalasi dengan metode *Acute Toxic Class Method* tidak memerlukan uji pendahuluan untuk menentukan konsentrasi awal.

Hasil toksisitas akut inhalasi dievaluasi berdasarkan kriteria toksik dari GHS (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*) yang tercantum dalam *Guidance Document on Inhalation Toxicity Studies Series on Testing and Assessment* No. 39 (Second Edition) (2018) seperti Tabel 28 sampai Tabel 31. Nilai toksisitas inhalasi akut dinyatakan sebagai (perkiraan) nilai LC_{50} atau sebagai *Acute Toxicity Estimates* (ATE). Konsentrasi yang akan digunakan dalam uji batas adalah batas atas Kelas 4 (20000 ppm untuk gas, 20 mg/l untuk uap, dan 5 mg/l untuk aerosol).

Tabel 28. Sistem GHS untuk Klasifikasi Toksisitas Akut Inhalasi

	LC_{50}		
Kelas GHS	Gas (ppm)	Uap (mg/L)	Aerosol (mg/L)
1	100	0.5	0.05
2	>100 dan 500	>0.5 dan 2	>0.05 dan 0.5
3	>500 dan 2500	>2 dan 10	>0.5 dan 1
4	>2500 dan 20000	>10 dan 20	>1 dan 5
5	>20000	>20	>5

Tabel 29 Konversi GHS dari Nilai Rentang Toksisitas Akut ke Perkiraan Titik Toksisitas Akut (*Acute Toxicity Point Estimates*) untuk Gas

Kelas Klasifikasi atau Perkiraan Risiko Toksisitas Akut yang diperoleh dari Eksperimental (ppm)	Konversi Perkiraan Titik Toksisitas Akut (ppm)[a]
0<Kelas 1= 100	10
100<Kelas 2= 500	100
500<Kelas 3= 2500	700
2500<Kelas 4= 20000	4500
Kelas 5>20000[a]	Dapat dilihat pada catatan [b]

Tabel 30. Konversi GHS dari Nilai Rentang Toksisitas Akut ke Perkiraan Titik Toksisitas Akut (*Acute Toxicity Point Estimates*) untuk Uap

Kelas Klasifikasi atau Perkiraan Risiko Toksisitas Akut yang diperoleh dari Eksperimental (mg/L)	Konversi Perkiraan Titik Toksisitas Akut (mg/L)[a]
0<Kelas 1= 0.5	0.05
0.5<Kelas 2= 2.0	0.5
2.0<Kelas 3= 10.0	3
10.0<Kelas 4= 20.0	11
Kelas 5>20.0[a]	Dapat dilihat pada catatan [b]

Tabel 31. Konversi GHS dari Nilai Rentang Toksisitas Akut ke Perkiraan Titik Toksisitas Akut (*Acute Toxicity Point Estimates*) untuk Aerosol

Kelas Klasifikasi atau Perkiraan Risiko Toksisitas Akut yang diperoleh dari Eksperimental (mg/L)	Konversi Perkiraan Titik Toksisitas Akut (mg/L)[a]
0<Kelas 1= 0.05	0.005
0.05<Kelas 2= 0.5	0.05
0.05<Kelas 3= 1.0	0.5
1.0<Kelas 4= 5.0	1.5
Kelas 5>5.0[a]	Dapat dilihat pada catatan [b]

Catatan:

a. Nilai-nilai ini dirancang untuk digunakan dalam perhitungan *Acute Toxicity Estimate* (ATE) untuk klasifikasi campuran berdasarkan komponennya dan tidak dapat mewakilkan hasil pengujian. Nilai-nilai secara konservatif ditetapkan pada ujung bawah kisaran Kelas 1 dan 2, serta pada titik sekitar sepersepuluh dari ujung bawah kisaran untuk Kelas 3-5.

b. Kriteria untuk Kategori 5 dimaksudkan untuk memungkinkan identifikasi zat yang memiliki bahaya toksisitas akut yang relatif rendah tetapi dalam keadaan tertentu dapat menimbulkan bahaya bagi populasi rentan. Menyadari kebutuhan untuk melindungi kesejahteraan hewan, pengujian pada hewan dalam rentang Kategori 5 tidak disarankan dan hanya boleh dipertimbangkan ketika ada

kemungkinan kuat bahwa hasil tes semacam itu akan memiliki relevansi langsung untuk melindungi kesehatan manusia.

5.c.2.1. Penyiapan Hewan Uji

Hewan yang digunakan adalah tikus (galur Sprague Dawley atau Wistar) atau jika menggunakan spesies lain harus disertai dengan justifikasi. Kriteria hewan uji meliputi:

a. Sehat dan dewasa
b. Jika digunakan hewan betina maka harus yang belum pernah beranak (*nullipara*) dan tidak sedang bunting
c. Pada permulaan uji, setiap hewan harus berumur 8-12 minggu dengan variasi berat badan tidak boleh melebihi 20% dari rata-rata berat badan semua hewan sebelum pajanan pada jenis kelamin dan umur hewan yang sama.
d. Hewan diseleksi secara acak, diberi tanda untuk identifikasi tiap-tiap hewan, dan dilakukan aklimatisasi sekurang-kurangnya 5 hari sebelum diberi perlakuan.

Sebelum dan sesudah pemajanan, hewan uji harus dikandangkan sesuai kelompok berdasarkan jenis kelamin dan konsentrasi, tetapi jumlah hewan per kandang tidak boleh mengganggu pengamatan yang jelas dari setiap hewan dan harus meminimalkan kerugian akibat kanibalisme dan perkelahian. Jika hewan diberikan pajanan hidung saja *(nose-only)*, mungkin perlu dilakukan penyesuaian dengan tabung penahan (*restraining tube*). Tabung penahan tidak boleh menimbulkan tekanan fisik, termal, atau imobilisasi yang tidak semestinya pada hewan yang dapat mempengaruhi titik akhir fisiologis seperti suhu tubuh (hipertermia) dan/atau volume menit pernapasan. Jika tersedia data yang menunjukkan tidak ada perubahan yang terjadi sampai batas tertentu, maka tidak diperlukan pra-adaptasi pada tabung penahan. Hewan uji yang mendapat pajanan sediaan aerosol melalui bejana seluruh tubuh (*whole-body*) harus ditempatkan secara individual selama pemajanan untuk menghindari terjadinya penyaringan aerosol melalui bulu hewan uji lain dan mencegah tertelannya sediaan uji karena *grooming* dari hewan sekandang.

5.c.2.2. Bejana Inhalasi

Sifat sediaan uji dan tujuan pengujian harus dipertimbangkan saat memilih bejana inhalasi. Mode pajanan yang lebih dipilih adalah hidung atau *nose-only*. Pajanan bejana *nose-only* umumnya dipilih untuk sediaan uji yang berupa aerosol cair atau padat dan uap yang dapat mengembun membentuk aerosol. Untuk tujuan khusus kemungkinan akan lebih baik dicapai dengan menggunakan mode pajanan seluruh tubuh (*whole-body*) dengan justifikasi tertentu. Pada penggunaan bejana seluruh tubuh, untuk memastikan stabilitas atmosfer maka volume total hewan uji tidak boleh melebihi 5% dari volume bejana.

5.c.2.3. Pemberian Sediaan Uji

Direkomendasikan durasi pajanan yang tetap selama empat jam, tidak termasuk waktu ekuilibrasi. Durasi waktu lain mungkin diperlukan untuk memenuhi persyaratan khusus, namun justifikasi harus diberikan dalam laporan studi. Hewan uji yang mendapat pajanan sediaan aerosol melalui bejana seluruh tubuh (*whole-body*) harus ditempatkan secara individual selama pemajanan untuk menghindari terjadinya penyaringan aerosol melalui bulu hewan uji lain dan mencegah tertelannya sediaan uji karena *grooming* dari hewan sekandang. Pakan tidak boleh diberikan selama periode pemajanan sedangkan air dapat diberikan jika mode pajanan dilakukan melalui inhalasi bejana seluruh tubuh (*whole-body*).

Hewan dipaparkan sediaan uji yang berupa gas, uap, aerosol, atau campurannya. Keadaan fisik yang akan diuji tergantung pada sifat fisika-kimia dari sediaan uji, konsentrasi yang dipilih, dan/atau bentuk fisik yang paling mungkin muncul selama penanganan dan penggunaan sediaan uji. Sediaan uji yang bersifat higroskopis dan reaktif secara kimia harus diuji dalam kondisi udara kering. Perhatian harus diberikan untuk menghindari timbulnya konsentrasi yang dapat meledak.

Pengukuran partikel harus dilakukan untuk semua aerosol dan uap yang mungkin mengembun membentuk aerosol. Untuk memungkinkan pemajanan sediaan uji di semua bagian pada saluran pernapasan, ukuran partikel aerosol direkomendasikan

dengan *mass median aerodynamic diameters* (MMAD)[1] mulai dari 1 - 4 μm dengan deviasi standar geometris atau *geometric standard deviation* (σg)[2] dalam kisaran 1,5 - 3,0.

Pembawa dapat digunakan untuk mendapatkan konsentrasi dan ukuran partikel sediaan uji yang sesuai pada atmosfer uji, dengan pilihan utama adalah air. Pemilihan pembawa harus didasarkan pada pengalaman sebelumnya, pola penggunaan, atau batasan fisik (kelarutan dan stabilitas sediaan uji, ukuran partikel). Jenis dan konsentrasi pembawa tidak boleh mengganggu hasil uji yang terkait dengan stabilitas analitik atau toksisitas sediaan uji di udara. Bahan partikulat dapat mengalami proses mekanis untuk mencapai distribusi ukuran partikel yang diperlukan, namun harus diperhatikan agar tidak menguraikan atau mengubah sediaan uji. Dalam kasus dimana proses mekanis diyakini telah mengubah komposisi sediaan uji (misalnya suhu ekstrim dari *milling* yang berlebihan akibat gesekan), komposisi sediaan uji harus diverifikasi secara analitik. Perhatian khusus harus diberikan agar tidak mengkontaminasi sediaan uji. Tidak perlu dilakukan pengujian terhadap bahan granular yang tidak rapuh, yang sengaja diformulasikan agar tidak dapat terhirup. Uji atrisi harus digunakan untuk menunjukkan bahwa partikel yang dapat terhirup tidak diproduksi saat bahan granular diuji. Jika uji atrisi menghasilkan bahan yang dapat terhirup, maka uji toksisitas inhalasi harus dilakukan.

Kelompok kontrol negatif (udara) tidak diperlukan pada uji toksisitas inhalasi akut. Jika bahan pembawa yang digunakan selain air maka kelompok kontrol pembawa diperlukan bila data riwayat toksisitas inhalasi bahan pembawa tidak tersedia. Jika uji toksisitas dari sediaan uji yang diformulasikan dengan bahan pembawa menunjukkan tidak adanya toksisitas, maka bahan pembawa tersebut tidak toksik pada konsentrasi yang diuji, sehingga tidak diperlukan kontrol pembawa.

---

[1] MMAD adalah distribusi *mass median* yang sesuai deng dengan diameter aerodinamik. MMAD dan deviasi standar geometris digunakan untuk mendiskripsikan distribusi ukuran partikel aerosol berdasarkan massa dan ukuran partikel. Sebanyak 50% partikel berdasarkan massanya akan lebih kecil dibandingkan diameter median aerodinamiknya.

[2] Satuan untuk menunjukkan kisaran ukuran partikel. Distribusi partikel dipertimbangkan sebagai *monodisperse* ketika σg = 1.0-1.2, dan *polydisperse* ketika σg is >1.2

5.c.2.4. Uji Utama

Kelompok hewan terdiri 3 (tiga) hewan jantan dan 3 (tiga) hewan betina, atau 6 (enam) hewan dari jenis kelamin yang lebih rentan digunakan untuk setiap tahap atau tingkat konsentrasi. Jika spesies rodensial selain tikus diberikan pajanan pada hidung (*nose only*) maka durasi pajanan maksimum dapat disesuaikan untuk meminimalkan *distress* yang spesifik untuk spesies tersebut. Tingkat konsentrasi yang akan digunakan sebagai konsentrasi awal dipilih salah satu dari 4 (empat) tingkat konsentrasi tetap dan konsentrasi awal harus yang paling mungkin menghasilkan toksisitas pada beberapa hewan. Skema pengujian untuk gas, uap dan aerosol mewakili pengujian dengan nilai *cut-off* dari sistem GHS kategori 1-4 yaitu:

a. untuk gas: 100; 500; 2500; dan 20000 ppm durasi 4 jam
b. untuk uap: 0,5; 2; 10; dan 20 mg/l durasi 4 jam; dan
c. untuk aerosol: 0,05; 0,5; 1; dan 5 mg/l durasi 4 jam

Kategori 5 merupakan konsentrasi di atas masing-masing konsentrasi batas. Pengujian untuk tingkat konsentrasi berikutnya tergantung pada ada atau tidaknya kematian hewan pada pengujian tingkat konsentrasi sebelumnya sehingga kelompok hewan pada tingkat konsentrasi selanjutnya dapat terpapar pada konsentrasi tetap yang lebih tinggi atau lebih rendah. Prosedur pengujian dilakukan sesuai dengan skema pengujian pada Bab IV huruf UU, VV, dan WW hingga diperoleh klasifikasi sediaan uji menurut sistem *Globally Harmonized System* (GHS). Karena akurasi dalam mencapai setiap konsentrasi target adalah hal yang penting untuk memastikan klasifikasi dan pelabelan yang akurat maka wajib dilakukan *pre-test* (pengujian tanpa hewan).

Interval waktu pajanan antar kelompok ditentukan oleh onset, durasi, dan keparahan gejala toksik dari kelompok sebelumnya. Pemajanan hewan pada tingkat konsentrasi berikutnya harus ditunda sampai ada kepastian terkait kelangsungan hidup hewan yang diuji sebelumnya. Oleh karena itu interval waktu pemajanan berikutnya direkomendasikan agar diberikan jeda 3 – 4 hari untuk

memungkinkan pengamatan toksisitas yang tertunda.

5.c.2.5. Uji Batas

Uji batas dilakukan jika sediaan uji diketahui hampir tidak beracun, misalnya untuk mendapatkan respon toksik di atas batas konsentrasi yang diatur. Uji batas mengevaluasi konsentrasi batas yang ditargetkan atau jika secara teknis tidak dapat dicapai karena sifat fisikokimia sediaan uji (konsentrasi maksimum yang dapat dicapai). Informasi terkait toksisitas sediaan uji dapat diperoleh dari data senyawa uji/campuran/sediaan uji serupa, dengan mempertimbangkan identitas dan persentase komponen yang diketahui memiliki signifikansi toksikologis. Jika informasi terkait toksisitasnya terbatas atau tidak ada, atau sediaan uji diperkirakan toksik maka uji utama harus dilakukan.

Prosedur normal menggunakan 3 (tiga) hewan jantan dan 3 (tiga) hewan betina atau 6 (enam) hewan dari jenis kelamin yang lebih rentan yang dipaparkan sediaan uji pada konsentrasi batas yaitu masing-masing 20000 ppm untuk gas; 20 mg/l untuk uap dan 5 mg/l untuk aerosol. Pada pengujian bahan aerosol, uji batas bertujuan untuk mencapai ukuran partikel yang dapat terhirup (yaitu MMAD 1 - 4 μm). Hal ini dimungkinkan dengan sebagian besar sediaan uji pada konsentrasi 2 mg/l. Pengujian aerosol lebih dari 2 mg/l hanya boleh dilakukan jika ukuran partikel yang dapat terhirup dapat dicapai. GHS mencegah pengujian melebihi konsentrasi batas karena alasan kesejahteraan hewan. Pengujian GHS kategori 5 hanya boleh dipertimbangkan jika ada kemungkinan kuat bahwa hasil uji memiliki relevansi langsung untuk melindungi kesehatan manusia dan diberikan justifikasi pada laporan pengujian. Untuk menghindari penggunaan hewan yang tidak perlu, *pre-test* (pengujian tanpa hewan) harus dilakukan sebelum uji batas untuk memastikan bahwa kondisi bejana pengujian dapat dicapai.

5.c.2.6. Pengamatan

Hewan uji harus sering diamati secara klinis selama periode pajanan. Setelah pajanan, pengamatan klinis harus dilakukan setidaknya dua kali pada hari pajanan, atau lebih sering jika diindikasikan terdapat respons hewan terhadap perlakuan, dan

setidaknya sekali sehari setelahnya selama total 14 hari. Namun durasi pengamatan dapat bervariasi dan diperpanjang tergantung dari gejala toksik dan waktu *onse*t serta lama periode pemulihan. Waktu timbul dan menghilangnya tanda-tanda toksisitas merupakan hal penting, terutama jika ada kecenderungan penundaan tanda-tanda toksisitas. Semua pengamatan dicatat secara sistematis dalam catatan individual yang dilakukan untuk setiap hewan. Hewan yang ditemukan dalam kondisi hampir mati dan hewan yang menunjukkan kesakitan parah harus dikorbankan secara manusiawi dengan alasan kesejahteraan hewan. Hewan uji yang dikorbankan atau ditemukan mati, waktu kematiannya harus dicatat. Pengamatan terhadap gejala toksisitas perlu dilakukan dengan hati-hati terutama gejala yang dapat disebabkan karena prosedur pemajanan seperti kondisi awal yang buruk dan perubahan pernapasan sementara, agar tidak disalahartikan sebagai toksisitas karena sediaan uji yang memerlukan pemngorbanan dini pada hewan uji. Jika hewan dikorbankan karena alasan manusiawi atau ditemukan mati maka waktu kematian harus dicatat setepat mungkin.

Pengamatan hewan di dalam kandang meliputi perubahan pada: kulit, bulu, mata, membran mukosa, dan juga sistem pernapasan, peredaran darah, sistem saraf otonom dan saraf pusat, serta aktivitas somatomotor dan tingkah laku. Jika memungkinkan, perbedaan apa pun antara efek lokal dan sistemik harus diperhatikan. Selain itu, perlu juga pengamatan pada kondisi: gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, tidur dan koma. Pengukuran suhu rektal dapat dilakukan untuk memberikan bukti pendukung terhadap gejala refleks bradipnea atau hipo/ahipertermia terkait dengan pengujian atau pengurungan hewan dalam kandang.

a. Berat Badan

   Berat badan masing-masing hewan harus dicatat satu kali selama periode aklimatisasi; sesaat sebelum diberikan sediaan uji (hari ke 0); dan setidaknya pada hari ke-1, 3, 7 setelah pemajanan dan setiap minggu setelahnya; serta pada saat kematian atau eutanasia jika melebihi hari ke-1. Berat badan

merupakan indikator kritis dari toksisitas sehingga hewan yang menunjukkan penurunan terus menerus > 20%, dibandingkan dengan berat sebelum pengujian harus dipantau dengan ketat. Pada akhir penelitian, hewan yang masih bertahan hidup, ditimbang dan dikorbankan secara manusiawi di akhir periode pasca pajanan.

b. Pemeriksaan Patologi

Seluruh hewan uji, termasuk yang mati selama pengujian atau yang dieutanasia dan yang dikeluarkan dari pengujian karena alasan kesejahteraan hewan harus dilakukan nekropsi. Jika nekropsi tidak dapat dilakukan segera setelah hewan mati maka hewan tersebut harus disimpan dalam lemari pendingan (tidak dibekukan) pada suhu yang cukup rendah untuk meminimalkan autolisis. Nekropsi harus dilakukan sesegera mungkin, biasanya dalam satu atau dua hari. Semua perubahan patologi yang parah harus dicatat untuk setiap hewan uji dengan perhatian khusus pada setiap perubahan di saluran pernapasan.

Pemeriksaan tambahan termasuk *a priori* dengan desain dapat dipertimbangkan untuk memperluas interpretasi hasil pengujian, seperti mengukur berat paru-paru pada hewan uji yang masih hidup, dan/atau memberikan bukti iritasi dengan pemeriksaan mikroskopis saluran pernapasan. Pemeriksaan organ dapat juga dilakukan pada hewan yang bertahan hidup selama 24 jam atau lebih yang menunjukkan adanya perubahan makropatologi, dan organ yang diketahui atau diperkirakan akan terpengaruh. Pemeriksaan mikroskopis pada seluruh saluran pernapasan dapat memberikan informasi yang berguna untuk sediaan uji yang reaktif terhadap air, seperti sediaan uji yang bersifat asam dan higroskopis.

5.c.2.7. Pengumpulan Data dan Analisis

a. Data

Data berat badan dan temuan nekropsi masing-masing hewan harus tersedia. Data pengamatan klinis harus diringkas dalam bentuk tabel, menunjukkan jumlah hewan yang digunakan pada

setiap kelompok uji, jumlah hewan yang menunjukkan tanda-tanda toksisitas spesifik, jumlah hewan yang ditemukan mati selama pengujian atau dikorb karena alasan kesejahteraan hewan, waktu kematian masing-masing hewan, gambaran dan perjalanan waktu efek toksik, reversibilitas, dan temuan nekropsi.

b. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Tinjauan Pustaka
3. Metode
   a. Hewan uji dan pemeliharaannya
      - Gambaran kondisi kandang, termasuk: jumlah (atau perubahan jumlah) hewan per kandang, bahan alas tidur, suhu lingkungan dan kelembaban relatif, fotoperiode, dan identifikasi pakan;
      - Spesies / galur yang digunakan dan justifikasi penggunaan spesies selain tikus;
      - Jumlah, umur dan jenis kelamin hewan;
      - Metode pengacakan;
      - Rincian kualitas pakan dan air (termasuk jenis/sumber pakan, sumber air);
      - Gambaran setiap pengkondisian pre-test termasuk pakan, karantina, dan pengobatan untuk penyakit;
   b. Sediaan uji:
      - Sifat fisik, kemurnian dan, jika relevan, sifat fisika-kimia (termasuk isomerisasi);
      - Data identifikasi dan Nomor Registrasi *Chemical Abstract Services* (CAS), jika diketahui;
   c. Bahan pembawa
      - Justifikasi penggunaan dan pemilihan bahan pembawa (jika selain air);
      - Data riwayat atau penggunaan bersamaan yang menunjukkan bahwa bahan pembawa tidak mengganggu hasil pengujian;
   d. Bejana inhalasi
      - Gambaran bejana inhalasi termasuk dimensi dan volume;

- Sumber dan gambaran peralatan yang digunakan untuk pajanan hewan serta pembentukan atmosfer;
- Peralatan untuk mengukur suhu, kelembaban, ukuran partikel, dan konsentrasi aktual;
- Sumber udara dan pengolahan udara yang disuplai/diekstraksi dan sistem yang digunakan untuk pengkondisian;
- Metode yang digunakan untuk kalibrasi peralatan untuk memastikan atmosfer uji yang homogen;
- Perbedaan tekanan (positif atau negatif);
- Portsl pajanan per bejana (*nose only*); lokasi hewan dalam sistem (*whole body*);
- Homogenitas temporal/stabilitas atmosfer uji;
- Lokasi sensor suhu dan kelembaban dan pengambilan sampel atmosfer uji di dalam bejana;
- Laju aliran udara, laju aliran udara/portal pajanan (*nose only*), atau muatan hewan (*whole body*);
- Informasi tentang peralatan yang digunakan untuk mengukur oksigen dan karbon dioksida, jika ada;
- Waktu yang dibutuhkan untuk mencapai keseimbangan bejana inhalasi (t_{95})
- Jumlah perubahan volume per jam;
- Perangkat pengukur/*metering devices* (jika ada);

e. Data pajanan:

- Alasan pemilihan konsentrasi target dalam uji utama;
- Konsentrasi nominal (massa total sediaan uji yang dihasilkan ke dalam bejana inhalasi dibagi dengan volume udara yang melewati bejana tersebut);
- Konsentrasi sediaan uji yang sebenarnya/aktual dikumpulkan dari zona pernapasan hewan; untuk campuran uji yang menghasilkan bentuk fisik heterogen (gas, uap, aerosol), masing-masing dapat dianalisis secara terpisah;
- Semua konsentrasi udara harus dilaporkan dalam satuan massa (misalnya mg / L, mg / m^3, dll.); satuan volume (misalnya ppm, ppb, dll.) juga dapat dilaporkan dalam tanda kurung;

- Distribusi ukuran partikel, *mass median aerodynamic diameter* (MMAD), dan deviasi standar geometris (σg), termasuk metode penghitungannya. Analisis ukuran partikel individu harus dilaporkan;

f. Kondisi pengujian:
- Rincian penyiapan sediaan uji, termasuk rincian setiap prosedur yang digunakan untuk mengurangi ukuran partikel serbuk atau untuk menyiapkan larutan sediaan uji;
- Uraian (termasuk diagram) peralatan yang digunakan untuk menghasilkan atmosfer uji dan untuk memaparkan hewan ke atmosfer uji;
- Rincian metode analisis kimia yang digunakan dan validasi metode (termasuk efisiensi perolehan kembali sediaan uji dari media sampling);
- Alasan pemilihan konsentrasi uji.

4. Hasil
   a. Data suhu, kelembaban dan aliran udara
   b. Data konsentrasi nominal dan aktual pada bejana
   c. Data distribusi ukuran partikel termasuk data pengumpulan sampel analitis, distribusi ukuran partikel dan perhitungan MMAD dan σg
   d. Data respon dan tingkat konsentrasi untuk setiap hewan (yaitu hewan yang menunjukkan tanda-tanda toksisitas termasuk kematian, sifat, keparahan, waktu onset, dan durasi efek)
   e. Data berat badan masing-masing hewan pada hari pajanan; dalam interval mingguan setelahnya, dan pada saat kematian atau euthanasia; tanggal dan waktu kematian jika sebelum eutanasia terjadwal, perjalanan waktu timbulnya tanda-tanda toksisitas dan apakah gejala ini dapat disembuhkan untuk setiap hewan
   f. Data berat organ, makropatologi dan temuan histopatologi, jika ada
   g. Data klasifikasi kategori GHS dan nilai *cut-off* LC_{50}
5. Pembahasan
6. Diskusi dan Interpretasi Hasil

a. Penekanan khusus harus diberikan pada deskripsi metode yang digunakan untuk memenuhi kriteria Pedoman Tes, misalnya konsentrasi batas atau ukuran partikel;
b. Respirabilitas partikel sehubungan dengan keseluruhan temuan, terutama jika kriteria ukuran partikel tidak dapat dipenuhi;
c. Konsistensi metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi nominal dan aktual, dan hubungan konsentrasi aktual dengan konsentrasi nominal harus dimasukkan dalam penilaian uji secara keseluruhan;
d. Kemungkinan penyebab kematian dan cara kerja yang dominan (sistemik versus lokal);
e. Penjelasan harus diberikan jika ada kebutuhan untuk mengorbankan hewan yang kesakitan atau menunjukkan tanda-tanda yang parah dan berkepanjangan.

7. Kesimpulan
8. Daftar Pustaka

5.c.3. METODE TRADISIONAL DAN Cxt

Metode Protokol Tradisional/Konvensional, kelompok hewan dipaparkan pada konsentrasi batas (uji batas) atau serangkaian konsentrasi dalam prosedur bertahap untuk durasi yang telah ditentukan biasanya 4 jam. Jangka waktu pemajanan lainnya dapat diterapkan untuk tujuan spesifik. kelompok hewan dipaparkan pada konsentrasi batas (uji batas) atau serangkaian konsentrasi dalam prosedur bertahap untuk durasi yang telah ditentukan biasanya 4 jam. Jangka waktu pemajanan lainnya dapat diterapkan untuk memenuhi tujuan pengaturan tertentu.

Metode kedua adalah Protokol (C x t) di mana kelompok hewan terpapar pada satu konsentrasi batas *(limit concentration)* atau serangkaian konsentrasi senyawa uji selama beberapa durasi. Hewan yang hampir mati atau hewan yang mengalami kesakitan atau menunjukkan tanda-tanda keparahan dan berkepanjangan harus dikorbankan secara manusiawi, dan dipertimbangkan dalam interpretasi hasil pengujian dengan cara yang sama seperti hewan

yang mati dalam pengujian. Beberapa kelompok hewan uji dipaparkan sediaan uji pada beberapa tingkat konsentrasi untuk beberapa durasi waktu secara inhalasi melalui bejana hidung (*nose only*). Tujuan uji toksisitas akut inhalasi dengan metode ini adalah untuk mendapatkan perkiraan pengaruh waktu pada konsentrasi dan informasi pada nilai LC10 atau LC01.

5.c.3.1. Penyiapan Hewan Uji

Hewan yang digunakan adalah atau jika menggunakan spesies lain harus disertai dengan justifikasi. Kriteria hewan uji meliputi:

a. Sehat dan dewasa
b. Jika digunakan hewan betina maka harus yang belum pernah beranak (*nullipara*) dan tidak sedang bunting
c. Pada permulaan uji, setiap hewan harus berumur 8-12 minggu dengan variasi berat badan tidak boleh melebihi 20% dari rata-rata berat badan semua hewan sebelum pajanan pada jenis kelamin dan umur hewan yang sama.
d. Hewan diseleksi secara acak, diberi tanda untuk identifikasi tiap-tiap hewan, dan dilakukan aklimatisasi sekurang-kurangnya 5 hari sebelum diberi perlakuan. Hewan juga harus diaklimatisasi terhadap apparatus/alat uji dalam waktu pendek sebelum pengujian sehingga mengurangi *stress* yang disebabkan lingkungan yang baru.

Sebelum dan sesudah pemajanan, hewan uji harus dikandangkan sesuai kelompok berdasarkan jenis kelamin dan konsentrasi, tetapi jumlah hewan per kandang tidak boleh mengganggu pengamatan yang jelas dari setiap hewan dan harus meminimalkan kerugian akibat kanibalisme dan perkelahian. Jika hewan diberikan pajanan hidung saja *(nose-only)*, mungkin perlu dilakukan penyesuaian dengan tabung penahan/pengekang/khusus/restriksi (*restraining tube*). Tabung penahan/pengekang/khusus/restriksi tidak boleh menimbulkan tekanan fisik, termal, atau imobilisasi yang tidak semestinya pada hewan yang dapat mempengaruhi titik akhir fisiologis seperti suhu tubuh (hipertermia) dan/atau volume menit pernapasan. Jika tersedia data dengan kondisi uji yang sama (alat, suhu ruang, dll.) dan menunjukkan tidak ada perubahan yang

terjadi, maka pra-adaptasi pada tabung penahan tidak diperlukan. Hewan uji yang mendapat pajanan sediaan aerosol melalui bejana seluruh tubuh (*whole-body*) harus ditempatkan secara individual selama pemajanan untuk memastikan hewan mendapat pajanan aerosol secara individu melalui hidung.

5.c.3.2. Bejana Inhalasi

Sifat sediaan uji dan tujuan pengujian harus dipertimbangkan saat memilih bejana inhalasi. Mode pajanan inhalasi dilakukan melalui bejana inhalasi pada hidung atau *nose only* (mencakup kepala, hidung atau moncong) atau seluruh tubuh (*whole-body*). Mode pajanan yang lebih dipilih adalah hidung atau *nose-only*. Pajanan bejana *nose-only* umumnya dipilih untuk sediaan uji yang berupa aerosol cair atau padat dan uap yang dapat mengembun membentuk aerosol. Untuk tujuan khusus kemungkinan akan lebih baik dicapai dengan menggunakan mode pajanan seluruh tubuh (*whole-body*) dengan justifikasi tertentu. Khusus untuk uji toksisitas akut inhalasi dengan protocol C x t, mode pajanan inhalasi yang digunakan hanya bejana inhalasi pada hidung (*nose only*). Pada penggunaan bejana seluruh tubuh, untuk memastikan stabilitas atmosfer maka volume total hewan uji tidak boleh melebihi 5% dari volume bejana.

Metode pemajanan melalui bejana hidung meminimalkan pajanan melalui rute non-inhalasi dan memungkinkan pengujian hewan individu pada konsentrasi tinggi, seperti yang dipersyaratkan untuk uji batas (*limit* test) serta tanpa memerlukan material dalam jumlah besar. Keuntungan lebih lanjut meliputi; kemudahan pemeliharaan atmosfer uji yang homogen, potensi yang lebih kecil untuk ketidakstabilan sediaan uji (misalnya, reaksi dengan kotoran atau kelembaban), dan keseimbangan atmosfer bejana yang lebih cepat karena volume yang dibutuhkan lebih kecil. Namun, bejana hidung memerlukan pengendalian hewan selama periode pajanan, sehingga dapat menyebabkan lebih banyak stres daripada bejana seluruh tubuh. Namun, lebih mudah untuk mengendalikan hewan yang mengalami stress dari bejana hidung daripada bejana seluruh tubuh. Model pajanan yang dipilih harus dirancang untuk

meminimalkan rasa sakit, kesusahan, atau penderitaan yang dialami oleh hewan, dan sesuai dengan tujuan ilmiah penelitian.

5.c.3.3. Pemberian Sediaan Uji

Mode pajanan inhalasi pada hidung (*nose-only*) dapat dilakukan dalam durasi hingga 6 jam pada tikus. Jika menggunakan hewan uji mencit maka durasi mode pajanan pada hidung umumnya tidak boleh lebih dari 4 jam. Jika diperlukan durasi pengujian yang lebih lama maka harus disertai dengan justifikasi. Hewan uji yang mendapat pajanan sediaan aerosol melalui bejana seluruh tubuh (*whole-body*) harus ditempatkan secara individual selama pemajanan untuk menghindari terjadinya penyaringan aerosol melalui bulu hewan uji lain dan mencegah tertelannya sediaan uji karena *grooming* dari hewan sekandang. Pakan tidak boleh diberikan selama periode pemajanan sedangkan air dapat diberikan jika mode pajanan dilakukan melalui inhalasi bejana seluruh tubuh (*whole-body*).

Hewan dipaparkan sediaan uji yang berupa gas, uap, aerosol, atau campurannya. Keadaan fisik yang akan diuji tergantung pada sifat fisika-kimia dari sediaan uji, konsentrasi yang dipilih, dan/atau bentuk fisik yang paling mungkin muncul selama penanganan dan penggunaan sediaan uji. Sediaan uji yang bersifat higroskopis dan reaktif secara kimia harus diuji dalam kondisi udara kering. Perhatian harus diberikan untuk menghindari terjadinya lonjakan konsentrasi.

Pengukuran partikel harus dilakukan untuk semua aerosol dan uap yang mungkin mengembun membentuk aerosol. Untuk memungkinkan pemajanan sediaan uji di semua bagian pada saluran pernapasan, ukuran partikel aerosol direkomendasikan dengan *mass median aerodynamic diameters* (MMAD)[3] mulai dari 1 - 4 μm dengan deviasi standar geometris atau *geometric standard deviation* (σg)[4] dalam kisaran 1,5 - 3,0.

---

[3] MMAD adalah distribusi *mass median* yang sesuai deng dengan diameter aerodinamik. MMAD deviasi standar geometris digunakan untuk mendiskripsikan distribusi ukuran partikel aerosol berdasarkan massa dan ukuran partikel. Sebanyak 50% partikel berdasarkan massanya akan lebih kecil dibandingkan diameter median aerodinamiknya.

[4] Satuan untuk menunjukkan kisaran ukuran partikel. Distribusi partikel dipertimbangkan sebagai *monodisperse* ketika σg = 1.0-1.2, dan *polydisperse* ketika σg is >1.2

Pembawa dapat digunakan untuk mendapatkan konsentrasi dan ukuran partikel sediaan uji yang sesuai pada atmosfer uji, dengan pilihan utama adalah air. Pemilihan pembawa harus didasarkan pada pengalaman sebelumnya, pola penggunaan, atau batasan fisik (kelarutan dan stabilitas sediaan uji, ukuran partikel). Jenis dan konsentrasi pembawa tidak boleh mengganggu hasil uji yang terkait dengan stabilitas analitik atau toksisitas sediaan uji di udara. Bahan partikulat dapat mengalami proses mekanis untuk mencapai distribusi ukuran partikel yang diperlukan, namun harus diperhatikan agar tidak menguraikan atau mengubah sediaan uji. Dalam kasus dimana proses mekanis diyakini telah mengubah komposisi sediaan uji (misalnya suhu ekstrim dari *milling* yang berlebihan akibat gesekan), komposisi sediaan uji harus diverifikasi secara analitik. Perhatian khusus harus diberikan agar tidak mengkontaminasi sediaan uji. Tidak perlu dilakukan pengujian terhadap bahan granular yang tidak rapuh, yang sengaja diformulasikan agar tidak dapat terhirup. Uji atrisi harus digunakan untuk menunjukkan bahwa partikel yang dapat terhirup tidak diproduksi saat bahan granular diuji. Jika uji atrisi menghasilkan bahan yang dapat terhirup, maka uji toksisitas inhalasi harus dilakukan.

Kelompok kontrol negatif (udara) tidak diperlukan pada uji toksisitas inhalasi akut. Jika bahan pembawa yang digunakan selain air maka kelompok kontrol pembawa diperlukan bila data riwayat toksisitas inhalasi bahan pembawa tidak tersedia. Jika uji toksisitas dari sediaan uji yang diformulasikan dengan bahan pembawa menunjukkan tidak adanya toksisitas, maka bahan pembawa tersebut tidak toksik pada konsentrasi yang diuji, sehingga tidak diperlukan kontrol pembawa.

5.c.3.4. Uji Pendahuluan

5.c.3.4.1 Metode Tradisional

Tujuan dari uji pendahuluan adalah untuk memperkirakan potensi kimiawi sediaan uji; mengidentifikasi kerentanan pada jenis kelamin yang berbeda; dan menetapkan tingkat

konsentrasi pajanan untuk uji utama dalam rangka meminimalkan jumlah hewan uji yang digunakan.

Pemilihan konsentrasi untuk uji pendahuluan, harus memperhatikan semua informasi yang tersedia termasuk data (Q)SAR dan data sediaan uji yang sejenis. Hewan uji yang digunakan tidak lebih dari 3 (tiga) hewan per jenis kelamin per konsentrasi atau jika kerentanan jenis kelamin telah diketahui dapat digunakan tidak lebih dari 3 (tiga) hewan dari jenis kelamin yang rentan per konsentrasi. Uji pendahuluan dapat terdiri dari satu konsentrasi, tetapi bila diperlukan dapat menggunakan konsentrasi lebih dari satu. Uji pendahuluan sebaiknya tidak menggunakan banyak hewan dan konsentrasi seperti pada uji utama. Uji toksisitas akut inhalasi dengan metode *Acute Toxic Class* (TG 436) yang telah dilakukan sebelumnya dapat digunakan sebagai pengganti uji pendahuluan.

5.c.3.4.2. Metode Cxt

Tujuan dari uji pendahuluan adalah untuk memperkirakan potensi kimiawi sediaan uji; mengidentifikasi kerentanan pada jenis kelamin yang berbeda; dan menetapkan tingkat konsentrasi pajanan untuk uji utama dalam rangka meminimalkan jumlah hewan uji yang digunakan. Hewan uji yang digunakan tidak lebih dari 3 (tiga) hewan per jenis kelamin untuk mengetahui kerentanan pada jenis kelamin yang berbeda pada konsentrasi target yang dipilih. Hewan uji harus terpapar sediaan uji selama durasi tunggal, umumnya 240 menit.

Kelayakan atmosfer uji yang memadai harus dinilai selama pra-uji tanpa hewan. Uji pendahuluan tidak perlu dilakukan jika data kematian tersedia dari uji toksisitas akut inhalasi dengan metode *Acute Toxic Class* (TG 436). Pemilihan konsentrasi awal untuk uji pendahuluan, harus memperhatikan pola kematian dari kedua jenis kelamin dan semua konsentrasi uji dalam uji toksisitas akut inhalasi dengan metode *Acute Toxic Class* (TG 436).

5.c.3.5. Uji Batas

5.c.3.5.1. Metode Tradisional

Uji batas dilakukan jika sediaan uji diketahui atau diperkirakan hampir tidak toksik, misalkan untuk mendapatkan respons toksik di atas batas konsentrasi dari peraturan yang ditetapkan. Dalam uji batas, satu kelompok yang terdiri dari 3 (tiga) hewan per jenis kelamin dipaparkan sediaan uji pada 1 (satu) konsentrasi batas. Informasi terkait toksisitas sediaan uji dapat diperoleh dari data terkait senyawa uji/campuran/sediaan uji serupa, dengan mempertimbangkan identitas dan persentase komponen yang diketahui memiliki signifikansi toksikologis. Jika informasi terkait toksisitasnya sedikit atau tidak ada, atau sediaan uji diperkirakan beracun maka uji utama harus dilakukan.

Pemilihan konsentrasi batas tergantung pada persyaratan peraturan/ketentuan. Menurut sistem klasifikasi GHS, konsentrasi batas untuk gas, uap, dan aerosol masing-masing adalah 20000 ppm, 20 mg/l, dan 5 mg/l (atau konsentrasi maksimum yang dapat dicapai). Pada pengujian aerosol, tujuan utamanya adalah untuk mencapai ukuran partikel yang dapat terhirup (MMAD 1-4 μm). Hal ini dimungkinkan dengan sebagian besar sediaan uji pada konsentrasi 2 mg/l. Pengujian aerosol lebih dari 2 mg/l hanya boleh dilakukan jika ukuran partikel yang dapat terhirup dapat dicapai. GHS mencegah pengujian melebihi konsentrasi batas karena alasan kesejahteraan hewan. Konsentrasi batas sebaiknya hanya dipertimbangkan jika terdapat kemungkinan kuat bahwa hasil uji memiliki relevansi langsung dalam melindungi kesehatan manusia dan pelaksanaannya disertai dengan justifikasi. Untuk menghindari penggunaan hewan yang tidak perlu pada uji batas maka uji coba tanpa hewan (*pre-test*) harus dilakukan sebelumnya untuk memastikan bahwa kondisi bejana pengujian dapat tercapai.

Jika terdapat kematian atau kondisi hewan hampir mati pada konsentrasi batas maka hasil uji batas dapat berfungsi sebagai uji pendahuluan untuk pengujian lebih lanjut pada konsentrasi

lain pada uji utama.

Jika secara teknis konsentrasi batas tidak dapat dicapai karena sifat fisikokimia sediaan uji maka konsentrasi maksimum yang dapat dicapai harus diuji. Jika kurang dari 50% kematian terjadi pada konsentrasi maksimum yang dapat dicapai, maka tidak diperlukan pengujian lebih lanjut. Jika konsentrasi batas tidak dapat dicapai, laporan studi harus memberikan penjelasan dan data yang mendukung. Jika konsentrasi maksimum yang dapat dicapai dari uap tidak menimbulkan toksisitas, sediaan uji mungkin perlu dibuat sebagai aerosol cair.

5.c.5.2 Metode C x t

Konsentrasi awal (Sesi Pajanan I) akan menjadi konsentrasi batas atau konsentrasi yang dipilih peneliti berdasarkan pada uji pendahuluan. Pada Sesi Pajanan I terdapat 5 (lima) kelompok hewan, dimana setiap kelompok terdiri dari 1 (satu) hewan per jenis kelamin yang dipaparkan sediaan uji pada 1 (satu) konsentrasi, masing-masing pada durasi waktu 15, 30, 60, 120 dan 240 menit sehingga total hewan uji yang digunakan sebanyak 10 hewan uji (5 jantan dan 5 betina). Jika kerentanan jenis kelamin telah diketahui maka digunakan total 10 (sepuluh) hewan dari jenis kelamin yang rentan (2 hewan/konsentrasi/titik waktu) di setiap tingkat konsentrasi selama pengujian berikutnya.

Pemilihan konsentrasi batas tergantung pada persyaratan peraturan. Menurut sistem klasifikasi GHS, konsentrasi batas untuk gas, uap, dan aerosol masing-masing adalah 20000 ppm, 20 mg/l, dan 5 mg// (atau konsentrasi maksimum yang dapat dicapai). Untuk menghasilkan konsentrasi batas dari beberapa sediaan uji, terutama untuk uap dan aerosol, secara teknis merupakan suatu tantangan. Pada pengujian aerosol, tujuan utamanya adalah untuk mencapai ukuran partikel yang dapat terhirup (MMAD 1-4 μm). Hal ini dimungkinkan dengan sebagian besar sediaan uji pada konsentrasi 2 mg/l. Pengujian aerosol lebih dari 2 mg/l hanya boleh dilakukan jika ukuran partikel yang dapat terhirup dapat dicapai. GHS mencegah pengujian

melebihi konsentrasi batas karena alasan kesejahteraan hewan. Pengujian yang melebihi konsentrasi batas sebaiknya hanya dilakukan jika terdapat kemungkinan kuat bahwa hasil uji memiliki relevansi langsung dalam melindungi kesehatan manusia dan pelaksanaannya disertai dengan justifikasi. Untuk menghindari penggunaan hewan yang tidak perlu pada uji batas maka uji coba tanpa hewan (*pre-test*) harus dilakukan sebelumnya untuk memastikan bahwa kondisi bejana pengujian dapat tercapai.

Jika terdapat kematian atau kondisi hewan hampir mati pada konsentrasi awal maka hasil uji pada konsentrasi tersebut dapat berfungsi sebagai titik awal untuk pengujian lebih lanjut pada konsentrasi lain pada uji utama. Jika sifat fisik atau kimia sediaan uji tidak memungkinkan untuk mencapai konsentrasi batas maka konsentrasi maksimum yang dapat dicapai harus diuji. Jika kurang dari 50% kematian terjadi pada konsentrasi maksimum yang dapat dicapai maka tidak diperlukan pengujian lebih lanjut. Jika konsentrasi batas tidak dapat dicapai maka pada laporan pengujian harus diberikan penjelasan dan data yang mendukung. Jika konsentrasi maksimum yang dapat dicapai dari sediaan uji yang berupa uap tidak menimbulkan toksisitas maka sediaan uji perlu dibuat sebagai aerosol cair.

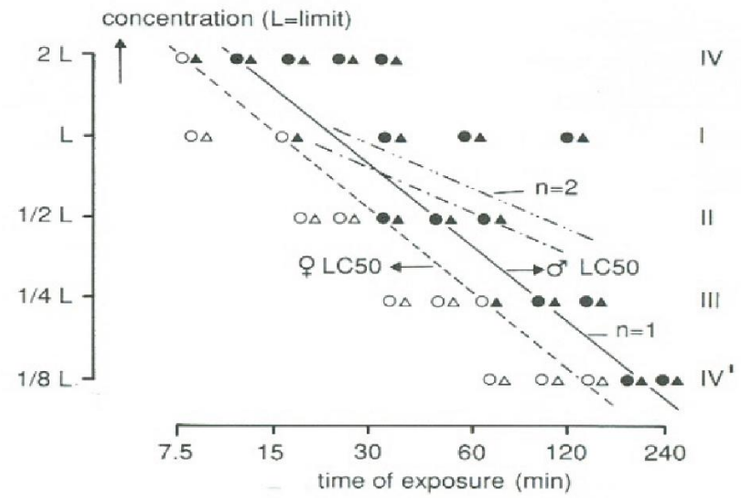


Figure 1: Hypothetical illustration of a concentration-time-mortality relationship in rats.

Open symbols = survivors; closed symbols = dead animals
Triangles = females; circles = males
Solid line = LC_{50} values (range 7.5-240 min) for males with n=1
Dashed line = LC_{50} values (range 7.5-240 min) for females with n=1
Dotted lines = hypothetical LC_{50} values line for males and females if n had been equal to 2 (12).

Gambar 13. Grafik Hubungan Konsetrasi-Waktu-Kematian

5.c.3.6. Uji Utama

5.c.3.6.1. Metode Tradisional

Hewan uji yang digunakan terdiri dari 5 (lima) hewan per jenis kelamin per konsentrasi atau jika kerentanan jenis kelamin telah diketahui dapat digunakan 5 (lima) hewan dari jenis kelamin yang rentan per konsentrasi. Kelompok konsentrasi yang digunakan paling sedikit terdiri dari 3 tingkatan konsentrasi dimana konsentrasi terendah diharapkan menghasilkan tingkat kematian yang rendah, dan konsentrasi tertinggi diharapkan dapat mematikan sebagian besar hewan. Hewan uji dipaparkan konsentrasi sediaan uji dalam prosedur bertahap. Interval waktu pemajanan antar kelompok konsentrasi ditentukan oleh onset, durasi, dan keparahan gejala toksik dari kelompok konsentrasi sebelumnya. Pemajanan hewan pada tingkat konsentrasi selanjutnya harus ditunda sampai ada kepastian terkait kelangsungan hidup hewan yang diuji sebelumnya. Hal ini memungkinkan peneliti untuk menyesuaikan konsentrasi pada kelompok berikutnya.

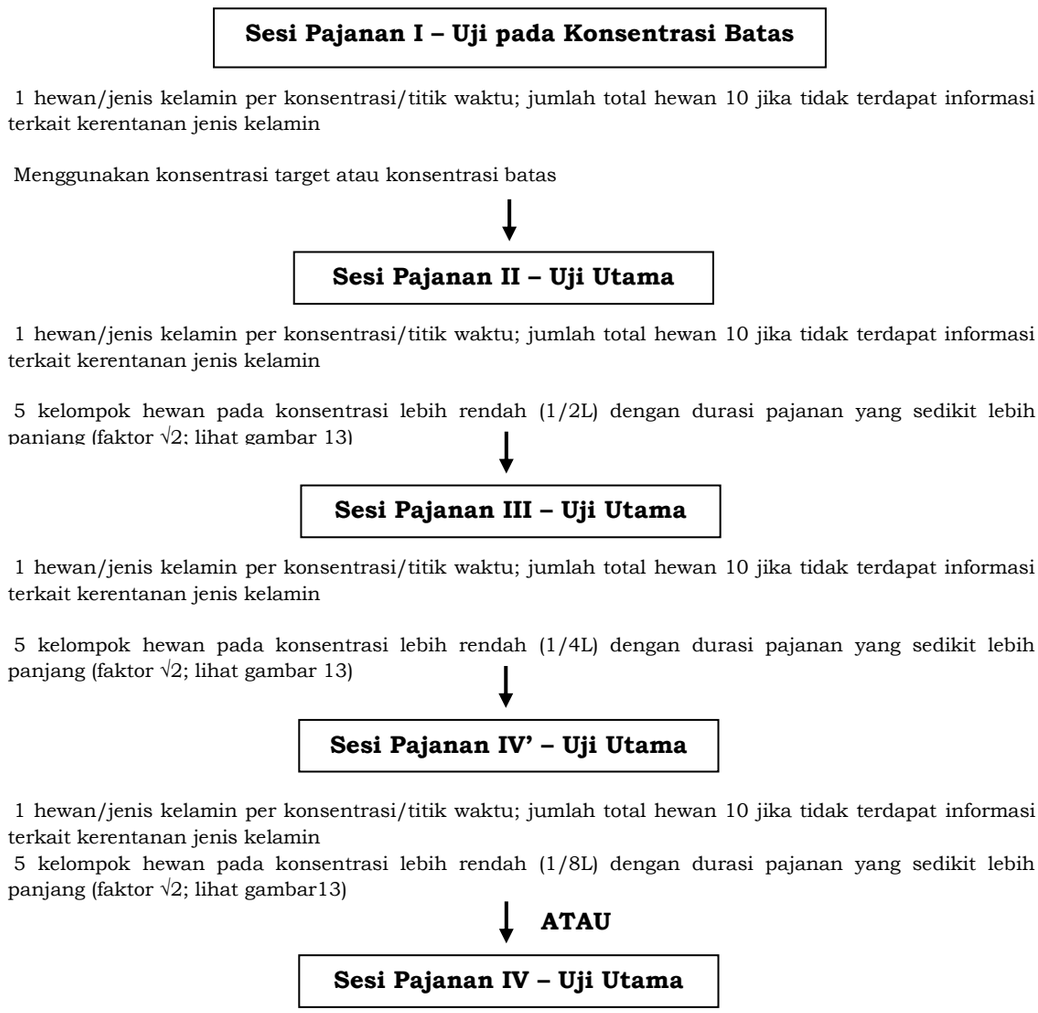
5.c.3.6.2. Metode Cxt

Konsentrasi awal (Sesi Pajanan I) yang diuji dalam uji utama akan menjadi konsentrasi batas atau konsentrasi yang dipilih oleh peneliti berdasarkan pada uji pendahuluan. Jika kematian teramati selama atau setelah Sesi Pajanan I, maka pajanan minimum (C x t) yang mengakibatkan kematian akan diambil sebagai panduan untuk menetapkan konsentrasi dan periode pemajanan pada Sesi Pajanan II. Uji utama merupakan pajanan selanjutnya yang dilakukan pada konsentrasi yang lebih rendah (pada Gambar 13: Sesi Pajanan II, III atau IV') atau pada konsentrasi yang lebih tinggi dengan menggunakan durasi yang lebih pendek (pada Gambar: sesi pajanan IV). Setiap sesi pajanan berikutnya akan bergantung pada sesi sebelumnya (lihat gambar 14).

Setiap sesi pajanan pada uji utama menggunakan 1 (satu) hewan per jenis kelamin per konsentrasi per titik waktu atau jika kerentanan jenis kelamin telah diketahui maka digunakan total 10 (sepuluh) hewan dari jenis kelamin yang rentan (2 hewan per konsentrasi per titik waktu). Dalam keadaan tertentu, pengujian dapat menggunakan 2 (dua) hewan per jenis kelamin per konsentrasi per titik waktu (atau 4 hewan dari jenis kelamin yang rentan per konsentrasi per titik waktu). Penggunaan 2 hewan per jenis kelamin per konsentrasi per titik waktu umumnya mengurangi bias dan variabilitas, meningkatkan tingkat keberhasilan, dan meningkatkan cakupan interval kepercayaan (*confidence interval*) relatif terhadap protocol.

Konsentrasi minimum (konsentrasi x waktu) yang mengakibatkan kematian pada konsentrasi batas (Sesi Pajanan I) akan dijadikan pedoman untuk menetapkan kombinasi konsentrasi dan durasi sesi pajanan berikutnya. Biasanya, konsentrasi pajanan berikutnya akan berkurang dua kali lipat (1/2L) dan hewan akan terpapar selama rentang waktu baru dengan menggunakan pembagian geometris periode pajanan dengan faktor 1.4 (atau $\sqrt{2}$) di sekitar waktu sesuai dengan tingkat konsentrasi kematian minimum (C x t) yang diamati

selama Sesi Pajanan I. Dalam gambar 13, kematian pada Sesi Pajanan I pertama kali diamati pada 15 menit; sehingga durasi Sesi Pajanan II dibuat menjadi 15, 21, 30, 42 dan 60 menit. Prosedur pengujian dalam protocol C x t ditunjukan seperti pada gambar 14.



Gambar 14. Prosedur dalam Protocol C x t

Idealnya, setiap sesi pajanan dilakukan dalam satu hari. Hal ini memberikan kesempatan untuk menunda sesi pajanan selanjutnya hingga ada keyakinan bahwa hewan uji dapat bertahan hidup dan memungkinkan peneliti untuk menyesuaikan konsentrasi target serta durasi pada sesi pajanan

berikutnya. Disarankan untuk memulai setiap sesi pajanan dengan kelompok hewan yang akan terpapar paling lama, misal kelompok pajanan 240 menit lalu diikuti oleh kelompok pajanan 120 menit, dan seterusnya. Jika hewan dalam kelompok pajanan 240 menit kondisinya hampir mati atau menunjukkan tanda-tanda toksisitas yang parah (misalnya perubahan ekstrim dalam pola pernapasan seperti sesak napas) setelah 90 menit maka tidak perlu dilakukan pajanan sampai 120 menit karena kemungkinan akan terjadi kematian 100%. Dengan demikian, peneliti harus memilih durasi pajanan yang lebih pendek untuk konsentrasi tersebut (misalnya 90, 65, 45, 33, dan 25 menit).

Pada banyak sediaan uji, hasil yang diperoleh pada konsentrasi awal (Sesi Pajanan I), bersama dengan tiga sesi pajanan pada uji utama dengan grid atau jarak waktu yang lebih kecil (yaitu jarak geometris periode pajanan seperti yang ditunjukkan oleh faktor antara periode berturut-turut, umumnya √2), akan cukup untuk menetapkan hubungan mortalitas C x t, tetapi jika data kurang memadai maka dapat menggunakan konsentrasi pajanan ke-5 [lihat gambar 2). Dalam kasus tertentu dimungkinkan untuk meningkatkan konsentrasi (2L) selama rentang waktu baru menggunakan pembagian geometris periode pajanan dengan faktor 1.4 (√2) di sekitar waktu sesuai dengan tingkat konsentrasi minimum yang menimbulkan kematian yang diamati selama Sesi Pajanan I. Durasi pajanan minimum sebaiknya lebih dari 5 menit dan durasi pajanan maksimum tidak boleh melebihi 8 jam.

Konsentrasi dalam bejana harus sering diukur untuk menentukan konsentrasi rata-rata terhadap waktu pada setiap durasi pajanan. Jika memungkinkan pada setiap interval C x t, data terkait konsentrasi rata-rata terhadap waktu dan durasi pajanan sampai kematian (jika kematian terjadi selama pajanan) harus digunakan dalam analisis statistik.

5.c.3.7. Pengamatan

Hewan uji harus sering diamati secara klinis selama periode

pajanan. Setelah pajanan, pengamatan klinis harus dilakukan setidaknya dua kali pada hari pajanan, atau lebih sering jika diindikasikan terdapat respon hewan terhadap perlakuan, dan setidaknya sekali sehari setelahnya selama total 14 hari. Namun durasi pengamatan dapat bervariasi dan diperpanjang tergantung dari gejala toksik dan waktu *onse*t serta lama periode pemulihan. Waktu timbul dan menghilangnya tanda-tanda toksisitas merupakan hal penting, terutama jika ada kecenderungan penundaan tanda-tanda toksisitas. Semua pengamatan dicatat secara sistematis dalam catatan individual yang dilakukan untuk setiap hewan. Hewan yang ditemukan dalam kondisi hampir mati dan hewan yang menunjukkan kesakitan parah harus dikorbankan secara manusiawi dengan alasan kesejahteraan hewan. Hewan uji yang dikorbankan atau ditemukan mati, waktu kematiannya harus dicatat. Pengamatan terhadap gejala toksisitas perlu dilakukan dengan hati-hati terutama gejala yang dapat disebabkan karena prosedur pemajanan seperti kondisi awal yang buruk dan perubahan pernapasan sementara, agar tidak disalahartikan sebagai toksisitas karena sediaan uji yang memerlukan pengorbanan dini pada hewan uji.

Pengamatan hewan di dalam kandang meliputi perubahan pada: kulit, bulu, mata, membran mukosa, dan juga sistem pernapasan, peredaran darah, sistem saraf otonom dan saraf pusat, serta aktivitas somatomotor dan tingkah laku. Jika memungkinkan, perbedaan apa pun antara efek lokal dan sistemik harus diperhatikan. Selain itu, perlu juga pengamatan pada kondisi: gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, tidur dan koma. Pengukuran suhu rektal dapat dilakukan untuk memberikan bukti pendukung terhadap gejala refleks bradipnea atau hipo/hipertermia terkait dengan pengujian atau penempatan hewan dalam kandang.

a. Berat Badan

   Berat badan masing-masing hewan harus dicatat satu kali selama periode aklimatisasi; sesaat sebelum diberikan sediaan uji (hari ke 0); dan setidaknya pada hari ke- 1, 3, 7 setelah pemajanan dan setiap minggu setelahnya; serta pada saat kematian atau eutanasia jika melebihi hari ke-1. Berat badan

merupakan indikator kritis dari toksisitas sehingga hewan yang menunjukkan penurunan terus menerus > 20 %, dibandingkan dengan berat sebelum pengujian harus dipantau dengan ketat. Pada akhir penelitian, hewan yang masih bertahan hidup, ditimbang dan dikorbankan secara manusiawi di akhir periode pasca pajanan.

b. Pemeriksaan Patologi

Seluruh hewan uji, termasuk yang mati selama pengujian atau yang dieutanasia dan yang dikeluarkan dari pengujian karena alasan kesejahteraan hewan harus dilakukan nekropsi. Jika nekropsi tidak dapat dilakukan segera setelah hewan mati maka hewan tersebut harus disimpan dalam lemari pendingin (tidak dibekukan) pada suhu yang cukup rendah untuk meminimalkan autolisis (pembusukan). Nekropsi harus dilakukan sesegera mungkin, biasanya dalam satu atau dua hari. Semua perubahan patologi secara makroskopik harus dicatat untuk setiap hewan uji dengan perhatian khusus pada setiap perubahan di saluran pernapasan.

Pemeriksaan tambahan termasuk desain yang ditentukan di awal pengujian *(a priori)* dapat dipertimbangkan untuk memperluas interpretasi hasil pengujian, seperti mengukur berat paru-paru pada hewan uji yang bertahan hidup, dan/atau memberikan bukti iritasi dengan pemeriksaan mikroskopis saluran pernapasan. Pemeriksaan organ dapat juga dilakukan pada hewan yang bertahan hidup selama 24 jam atau lebih yang menunjukkan adanya perubahan patologi secara makroskopik, dan organ yang diketahui atau diperkirakan akan terpengaruh. Pemeriksaan mikroskopis pada seluruh saluran pernapasan dapat memberikan informasi yang berguna untuk sediaan uji yang reaktif terhadap air, seperti sediaan uji yang bersifat asam dan higroskopis.

5.c.3.8. Pengumpulan Data dan Analisis

a. Data

Data berat badan dan temuan nekropsi masing-masing hewan harus tersedia. Data pengamatan klinis harus diringkas dalam

bentuk tabel, menunjukkan jumlah hewan yang digunakan pada setiap kelompok uji, jumlah hewan yang menunjukkan tanda-tanda toksisitas spesifik, jumlah hewan yang ditemukan mati selama pengujian atau dikorbankan karena alasan kesejahteraan hewan, waktu kematian masing-masing hewan, gambaran dan perjalanan waktu efek toksik, reversibilitas, dan temuan nekropsi.

b. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Tinjauan Pustaka
3. Metode
   a. Hewan uji dan pemeliharaannya
      - Gambaran kondisi kandang, termasuk: jumlah (atau perubahan jumlah) hewan per kandang, bahan alas tidur, suhu lingkungan dan kelembaban relatif, fotoperiode, dan identifikasi pakan;
      - Spesies / galur yang digunakan dan justifikasi penggunaan spesies selain tikus;
      - Jumlah, umur dan jenis kelamin hewan;
      - Metode pengacakan;
      - Rincian kualitas pakan dan air (termasuk jenis/sumber pakan, sumber air);
      - Gambaran setiap pengkondisian pre-test termasuk pakan, karantina, dan pengobatan untuk penyakit;
   b. Sediaan uji:
      - Sifat fisik, kemurnian dan, jika relevan, sifat fisika-kimia (termasuk isomerisasi);
      - Data identifikasi dan Nomor Registrasi *Chemical Abstract Services* (CAS), jika diketahui;
   c. Bahan pembawa
      - Justifikasi penggunaan dan pemilihan bahan pembawa (jika selain air);
      - Data riwayat atau penggunaan bersamaan yang menunjukkan bahwa bahan pembawa tidak mengganggu hasil pengujian;
   d. Bejana inhalasi
      - Gambaran bejana inhalasi termasuk dimensi dan volume;

- Spesifikasi dan gambaran peralatan yang digunakan untuk pajanan hewan serta pengkondisian atmosfer; Peralatan untuk mengukur suhu, kelembaban, ukuran partikel, dan konsentrasi aktual;
- Sumber udara dan pengolahan udara yang disuplai/diekstraksi dan sistem yang digunakan untuk pengkondisian;
- Metode yang digunakan untuk kalibrasi peralatan untuk memastikan atmosfer uji yang homogen;
- Perbedaan tekanan (positif atau negatif);
- Port pajanan per bejana (*nose only*); lokasi hewan dalam sistem (*whole body*);
- Homogenitas temporal/stabilitas atmosfer uji;
- Lokasi sensor suhu dan kelembaban dan pengambilan sampel atmosfer uji di dalam bejana;
- Laju aliran udara, laju aliran udara/portal pajanan (*nose only*), atau muatan hewan (*whole body*);
- Spesifikasi peralatan yang digunakan untuk mengukur oksigen dan karbon dioksida, jika ada;
- Waktu yang dibutuhkan untuk mencapai keseimbangan bejana inhalasi (t_{95})
- Jumlah perubahan volume per jam;
- Perangkat pengukur/*metering devices* (jika ada);

e. Data pajanan:

- Alasan pemilihan konsentrasi target dalam uji utama;
- Konsentrasi nominal (massa total sediaan uji yang dihasilkan ke dalam bejana inhalasi dibagi dengan volume udara yang melewati bejana tersebut);
- Konsentrasi sediaan uji yang sebenarnya/aktual dikumpulkan dari zona pernapasan hewan; untuk campuran uji yang menghasilkan bentuk fisik heterogen (gas, uap, aerosol), masing-masing dapat dianalisis secara terpisah;
- Semua konsentrasi udara harus dilaporkan dalam satuan massa (misalnya mg / L, mg / m^3, dll.); satuan volume (misalnya ppm, ppb, dll.) juga dapat dilaporkan dalam tanda kurung;

- Distribusi ukuran partikel, *mass median aerodynamic diameter* (MMAD), dan deviasi standar geometris (σg), termasuk metode penghitungannya. Analisis ukuran partikel individu harus dilaporkan;

f. Kondisi pengujian:
   - Rincian penyiapan sediaan uji, termasuk rincian setiap prosedur yang digunakan untuk mengurangi ukuran partikel serbuk atau untuk menyiapkan larutan sediaan uji;
   - Uraian (termasuk diagram) peralatan yang digunakan untuk menghasilkan atmosfer uji dan untuk memaparkan hewan ke atmosfer uji;
   - Rincian metode analisis kimia yang digunakan dan validasi metode (termasuk efisiensi perolehan kembali sediaan uji dari media sampling);
   - Alasan pemilihan konsentrasi uji.

4. Hasil
   a. Data suhu, kelembaban dan aliran udara
   b. Data jumlah bejana dan data konsentrasi aktual pada bejana
   c. Data ukuran partikel termasuk data pengumpulan sampel analitis, distribusi ukuran partikel dan perhitungan MMAD dan σg;
   d. Data respon dan tingkat konsentrasi untuk setiap hewan (yaitu hewan yang menunjukkan tanda-tanda toksisitas termasuk kematian, sifat, keparahan, waktu onset, dan durasi efek)
   e. Data berat badan masing-masing hewan pada hari pajanan; dalam interval mingguan setelahnya, dan pada saat kematian atau euthanasia; tanggal dan waktu kematian jika sebelum eutanasia terjadwal, perjalanan waktu timbulnya tanda-tanda toksisitas dan apakah gejala ini dapat disembuhkan untuk setiap hewan
   f. Data berat organ, makropatologi dan temuan histopatologi, jika ada

g. Perkiraan letalitas (misalnya LC_{50}, LD_{01}) termasuk batas kepercayaan 95%, dan kemiringan (jika disediakan oleh metode evaluasi);
h. Hubungan statistik, termasuk perkiraan eksponen n (protokol C x t). Nama perangkat lunak statistik yang digunakan harus diberikan;

5. Pembahasan
6. Diskusi dan Interpretasi Hasil
   a. Penekanan khusus harus diberikan pada deskripsi metode yang digunakan untuk memenuhi kriteria Pedoman Tes, misalnya konsentrasi batas atau ukuran partikel;
   b. Respirabilitas partikel sehubungan dengan keseluruhan temuan, terutama jika kriteria ukuran partikel tidak dapat dipenuhi;
   c. Penjelasan harus diberikan jika dilakukan tindakan mengorbankan hewan yang kesakitan atau menunjukkan tanda-tanda yang parah dan berkepanjangan;
   d. Jika pengujian dengan TG 436 (4) dihentikan karena lebih memilih TG 403, justifikasi harus diberikan;
   e. Konsistensi metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi nominal dan aktual, dan hubungan konsentrasi aktual dengan konsentrasi nominal harus dimasukkan dalam penilaian uji secara keseluruhan;
   f. Kemungkinan dan mekanisme kerja penyebab kematian yang dominan (sistemik atau lokal) perlu dijelaskan.
7. Kesimpulan
8. Daftar Pustaka

6. UJI TOKSISITAS SUBKRONIS INHALASI

6.a. PRINSIP

Sediaan uji dalam beberapa tingkat konsentrasi diberikan secara berulang melalui inhalasi pada beberapa kelompok hewan uji selama durasi waktu tertentu. Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama periode pemberian sediaan uji dan belum melewati

periode *rigor mortis* (kaku) segera dilakukan nekropsi. Selanjutnya organ dan jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup dilakukan nekropsi selanjutnya diamati secara makropatologi pada setiap organ serta dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis, dan histopatologi.

6.b. TUJUAN

Tujuan uji toksisitas inhalasi sbkronis dan subkronis ini untuk memperoleh informasi adanya:

a. Efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut inhalasi.
b. Efek toksik setelah pemajanan sediaan uji secara inhalasi dan berulang dalam jangka waktu tertentu.
c. Konsentrasi terendah yang tidak menimbulkan efek toksik (*No Observed-Adverse Effect-Consentration*/NOAEC).
d. Mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas setelah pemajanan sediaan uji secara inhalasi dan berulang dalam jangka waktu tertentu.

6.c. PROSEDUR

6.c.1. Penyiapan Hewan Uji

Hewan yang digunakan adalah tikus (galur Sprague Dawley atau Wistar) atau jika menggunakan spesies lain harus disertai dengan justifikasi. Kriteria hewan uji meliputi:

a. Sehat dan dewasa
b. Hewan betina harus yang belum pernah beranak (nulipara) dan tidak sedang bunting
c. Pada permulaan uji, setiap hewan harus berumur 7-9 minggu dengan variasi berat badan tidak boleh melebihi 20% dari rata-rata berat badan untuk setiap jenis kelamin

Hewan diseleksi secara acak dan diberi tanda untuk identifikasi tiap-tiap hewan, disarankan menggunakan penanda yang aman, tidak berbau, dan tidak mudah hilang untuk memudahkan pada saat pengamatan dan menghindari adanya keraguan, contoh penanda subkutan (*subcutaneous transponders*). Aklimatisasi dilakukan

sekurang-kurangnya 5 hari berturut-turut. Sebelum dan sesudah pemajanan, hewan ditempatkan dalam kandang berdasarkan jenis kelamin dan konsentrasi, tetapi jumlah hewan per kandang tidak boleh mengganggu pengamatan dari setiap hewan dan harus meminimalkan terjadinya kanibalisme dan perkelahian.

Jika menggunakan pajanan dengan bejana *nose-only*, hewan uji harus diaklimatisasi dengan tabung penahan (*restraining tube*). Tabung penahan tidak boleh menimbulkan tekanan fisik, termal, atau pembatasan pergerakan yang menyebabkan stress berlebihan pada hewan. Hewan uji yang mendapat pajanan sediaan aerosol melalui bejana seluruh tubuh (*whole-body*) harus ditempatkan secara individual selama pemajanan untuk menghindari terjadinya penyaringan aerosol melalui bulu hewan uji lain dan mencegah tertelannya sediaan uji karena *grooming* dari hewan sekandang.
Jumlah hewan tiap kelompok dan durasi pajanan yaitu:

a. Uji Toksisitas Subkronis Singkat Inhalasi 28 hari
    1) Kelompok kontrol negatif/udara atau kelompok pembawa, minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina;
    2) Kelompok perlakuan, masing-masing minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina dengan tiga atau lebih tingkatan konsentrasi;
    3) Kelompok satelit
        - Pada pengujian sediaan uji yang berpotensi tertahan di paru-paru (opsi B), diperlukan kelompok satelit yang terdiri dari 5 hewan jantan per konsentrasi yang dipaparkan bersamaan dengan kelompok uji utama dan dievaluasi pada *post-exposure observation*-1 (PEO-1). Hal ini bertujuan untuk mengukur beban paru pada saat penghentian pajanan dan memberikan informasi tentang dosis yang dipertahankan di paru-paru.
        - Pada pengukuran beban paru, dapat di1akukan penambahan 1 atau 2 kelompok satelit yang terdiri dari 5 hewan jantan per konsentrasi untuk mengukur beban paru pada titik waktu pasca pemajanan yang berbeda. Pengukuran beban paru tambahan (yaitu, PEO-2

dan/atau PEO-3) dapat dilakukan untuk memahami kinetika pembersihan (*clearance kinetics*) pasca pajanan sediaan uji. Kinetika pembersihan (*clearance kinetics*) umumnya memerlukan pengukuran beban paru pada tiga titik waktu.

- Pengukuran beban paru dilakukan dalam waktu 24 jam setelah penghentian pajanan (PEO-1) dan pada 2 PEO tambahan (PEO-2 dan PEO-3). Namun dalam beberapa kondisi, penggunaan 2 titik waktu sudah cukup memberikan informasi tentang kinetika pembersihan.
- Selain untuk mengukur beban paru, kelompok satelit juga digunakan untuk mengevaluasi pemulihan (*recovery*), persistensi, keterlambatan efek toksik baik pada desain uji opsi A maupun opsi B. Penjadwalan dan desain kelompok satelit tergantung pada sifat sediaan ujinya yaitu mengikuti opsi A atau opsi B. Kelompok satelit yang bertujuan untuk mengevaluasi pemulihan dilakukan pada 5 hewan jantan dan 5 hewan betina per tingkat konsentrasi (termasuk kelompok kontrol negatif/udara atau kelompok kontrol pembawa). Kelompok satelit pemulihan dipaparkan bersamaan dengan kelompok uji utama dan dievaluasi pada *post-exposure observation*-2 (PEO-2).
- Berdasarkan hasil uji pendahuluan dan informasi relevan lainnya yang tersedia, peneliti harus menentukan durasi periode pasca pajanan serta waktu PEO-2 untuk kelompok satelit pemulihan dan PEO-3 untuk kelompok satelit beban paru pada opsi B. Penjadwalan PEO-2 dan PEO-3 di opsi B tergantung pada tingkat pembersihan paru yang diharapkan dan durasi periode pemulihan pasca pajanan. Berikut ini terdapat beberapa opsi lain yang mungkin dilakukan:

  a. Peneliti dapat memilih untuk menjadwalkan PEO-3 sebelum kelompok pemulihan (PEO-2) (jika disertakan), jika dianggap lebih sesuai.

b. Jika penggunaan dua titik waktu pasca pajanan dianggap cukup, pengukuran beban paru dapat dilakukan di PEO-1 (uji utama) dan di PEO-2 (kelompok satelit pemulihan) saja, jika waktu untuk evaluasi pemulihan dan pembersihan paru-paru dapat diselaraskan satu sama lain. Kelompok satelit di PEO-3 kemudian dapat dihilangkan dari pengujian.
c. Peneliti dapat memilih untuk melakukan pengukuran beban paru di PEO-1 (uji utama) dan di PEO-3 (kelompok satelit satelit) dan menggunakan kedua jenis kelamin dari kelompok satelit pemulihan (PEO-2) untuk analisis BALF.

- Analisis BALF dilakukan pada saat penghentian pajanan (PEO-1) pada opsi A dan B; serta jika diperlukan pada PEO tambahan pada opsi B. Jika pengukuran beban paru dilakukan (opsi B) maka analisis BALF pada kelompok satelit pemulihan (PEO-2) hanya akan dilakukan pada hewan betina karena hewan jantan akan digunakan untuk pengukuran beban paru.
- Meskipun dalam Opsi B kelompok tambahan hanya diperlukan untuk pengukuran beban paru (uji utama di PEO-1 dan kelompok satelit di PEO-2 dan PEO-3), dapat dipertimbangkan untuk menggunakan hewan pada kelompok tambahan untuk pengamatan. Pengamatan dilakukan untuk memperoleh parameter tambahan yang dapat membantu pemahaman tentang toksikokinetik dan toksisitas (termasuk pemulihan) sediaan uji. Pengamatan yang dilakukan di PEO-1 dapat digunakan untuk memilih parameter tambahan yang akan diperiksa di PEO-3. Jika durasi waktu antara PEO-1 dan PEO-3 memungkinkan, misalnya dapat dilakukan histopatologi tambahan pada paru-paru kiri atau organ lain di PEO-3.

Penjelasan lengkap terkait penggunaan kelompok satelit dapat dilihat lebih lanjut pada Skema pengujian untuk toksisitas subkronis singkat 28 hari (Bab IV huruf XX dan ZZ)

b. Uji Toksisitas Subkronis Inhalasi 90 hari

1) Kelompok kontrol negatif/udara atau kelompok pembawa, minimal 20 ekor hewan yang terdiri dari 10 ekor hewan jantan dan 10 ekor hewan betina;
2) Kelompok perlakuan, masing-masing minimal 20 ekor hewan yang terdiri dari 10 ekor hewan jantan dan 10 ekor hewan betina dengan tiga atau lebih tingkatan konsentrasi;
3) Kelompok satelit
   - Pada pengujian sediaan uji yang berpotensi tertahan di paru-paru (opsi B), diperlukan kelompok satelit yang terdiri dari 5 hewan jantan per konsentrasi yang dipaparkan bersamaan dengan kelompok uji utama dan dievaluasi pada *post-exposure observation*-1 (PEO-1). Hal ini bertujuan untuk mengukur beban paru pada saat penghentian pajanan dan memberikan informasi tentang dosis yang dipertahankan di paru-paru.
   - Pada pengukuran beban paru, dapat di1akukan penambahan 1 atau 2 kelompok satelit yang terdiri dari 5 hewan jantan per konsentrasi untuk mengukur beban paru pada titik waktu pasca pemajanan yang berbeda. Pengukuran beban paru tambahan (yaitu, PEO-2 dan/atau PEO-3) dapat dilakukan untuk memahami kinetika pembersihan (*clearance kinetics*) pasca pajanan sediaan uji. Kinetika pembersihan (*clearance kinetics*) umumnya memerlukan pengukuran beban paru pada tiga titik waktu.
   - Pengukuran beban paru dilakukan dalam waktu 24 jam setelah penghentian pajanan (PEO-1) dan pada 2 PEO tambahan (PEO-2 dan PEO-3). Namun dalam beberapa kondisi, penggunaan 2 titik waktu sudah cukup memberikan informasi tentang kinetika pembersihan.
   - Selain untuk mengukur beban paru, kelompok satelit juga digunakan untuk mengevaluasi pemulihan (*recovery*), persistensi, keterlambatan efek toksik baik pada desain uji opsi A maupun opsi B. Penjadwalan dan desain kelompok satelit tergantung pada sifat sediaan

ujinya yaitu mengikuti opsi A atau opsi B. Kelompok satelit yang bertujuan untuk mengevaluasi pemulihan dilakukan pada 5 hewan jantan dan 5 hewan betina per tingkat konsentrasi (termasuk kelompok kontrol negatif/udara atau kelompok kontrol pembawa). Kelompok satelit pemulihan dipaparkan bersamaan dengan kelompok uji utama dan dievaluasi pada *post-exposure observation*-2 (PEO-2).

- Berdasarkan hasil uji pendahuluan dan informasi relevan lainnya yang tersedia, peneliti harus menentukan durasi periode pasca pajanan serta waktu PEO-2 untuk kelompok satelit pemulihan dan PEO-3 untuk kelompok satelit beban paru pada opsi B. Penjadwalan PEO-2 dan PEO-3 di opsi B tergantung pada tingkat pembersihan paru yang diharapkan dan durasi periode pemulihan pasca pajanan. Berikut ini terdapat beberapa opsi lain yang mungkin dilakukan:

  a. Peneliti dapat memilih untuk menjadwalkan PEO-3 sebelum kelompok pemulihan (PEO-2) (jika disertakan), jika dianggap lebih sesuai.
  b. Jika penggunaan dua titik waktu pasca pajanan dianggap cukup, pengukuran beban paru dapat dilakukan di PEO-1 (uji utama) dan di PEO-2 (kelompok satelit pemulihan) saja, jika waktu untuk evaluasi pemulihan dan pembersihan paru-paru dapat diselaraskan satu sama lain. Kelompok satelit di PEO-3 kemudian dapat dihilangkan dari pengujian.
  c. Peneliti dapat memilih untuk melakukan pengukuran beban paru di PEO-1 (uji utama) dan di PEO-3 (kelompok satelit satelit) dan menggunakan kedua jenis kelamin dari kelompok satelit pemulihan (PEO-2) untuk analisis BALF.

- Analisis BALF dilakukan pada saat penghentian pajanan (PEO-1) pada opsi A dan B; serta jika diperlukan pada PEO tambahan pada opsi B. Jika pengukuran beban paru dilakukan (opsi B) maka analisis BALF pada

kelompok satelit pemulihan (PEO-2) hanya akan dilakukan pada hewan betina karena hewan jantan akan digunakan untuk pengukuran beban paru.

- Meskipun dalam Opsi B kelompok tambahan hanya diperlukan untuk pengukuran beban paru (uji utama di PEO-1 dan kelompok satelit di PEO-2 dan PEO-3), dapat dipertimbangkan untuk menggunakan hewan pada kelompok tambahan untuk pengamatan. Pengamatan dilakukan untuk memperoleh parameter tambahan yang dapat membantu pemahaman tentang toksikokinetik dan toksisitas (termasuk pemulihan) sediaan uji. Pengamatan yang dilakukan di PEO-1 dapat digunakan untuk memilih parameter tambahan yang akan diperiksa di PEO-3. Jika durasi waktu antara PEO-1 dan PEO-3 memungkinkan, misalnya dapat dilakukan histopatologi tambahan pada paru-paru kiri atau organ lain di PEO-3.

Penjelasan lengkap terkait penggunaan kelompok satelit dapat dilihat lebih lanjut pada Skema pengujian untuk toksisitas subkronis 90 hari (Bab IV huruf ZZ dan AAA).

6.c.2. Penyiapan Sediaan Uji

Sediaan uji dapat berupa gas, uap, aerosol (cair dan padat) atau campurannya termasuk yang berukuran nano. Untuk meningkatkan deposisi atau pengendapan sediaan uji dalam paru maka direkomendasikan ukuran partikel aerosol dengan *mass median aerodynamic diameters* (MMAD) ≤ 2 μm dengan deviasi standar geometris atau *geometric standard deviation* (σg) dalam kisaran 1,0 - 3,0.

Untuk sediaan uji yang bersifat korosif atau iritan kuat perlu dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi target yang serendah mungkin sehingga tidak menimbulkan rasa sakit yang berat, namun cukup untuk memberikan kurva respon konsentrasi yang mencapai tujuan pengujian. Sediaan uji yang bersifat higroskopis dan reaktif harus diuji di bawah kondisi udara kering (*dry air*).

Idealnya, sediaan uji diuji tanpa menggunakan pembawa. Jika

digunakan pembawa, untuk mengatur konsentrasi dan ukuran partikel sediaan uji yang sesuai maka dapat digunakan pembawa berupa air jika memungkinkan. Stabilitas sediaan uji harus diperhatikan jika dilarutkan dalam larutan pembawa.

Konsentrasi maksimum yang diuji harus mempertimbangkan:

a. konsentrasi maksimum yang dapat dicapai;
b. kebutuhan menjaga suplai oksigen yang memadai;
c. dan/atau pertimbangan kesejahteraan hewan.

Jika tidak ada data terkait batasan konsentrasi maka dapat digunakan konsentrasi batas dari sistem GHS (yaitu, hingga konsentrasi maksimum 20.000 ppm untuk gas; 20 mg/L untuk uap; dan 5 mg/L untuk aerosol). Justifikasi perlu diberikan jika menggunakan konsentrasi melebihi konsentrasi batas terutama untuk sediaan uji berupa gas yang sangat mudah menguap (misalnya zat pendingin). Untuk pengujian partikel aerosol > 2 mg/L hanya boleh dilakukan jika dapat dicapai ukuran partikel yang dapat terhirup.

Kelompok kontrol negatif (udara) diperlakuan sama dengan kelompok uji dimana kelompok kontrol negatif hanya terpapar udara yang disaring (bukan sediaan uji). Air digunakan sebagai pembawa bila memungkinkan. Jika pembawa selain air digunakan untuk membantu menghasilkan atmosfer uji maka sebaiknya digunakan kelompok kontrol pembawa sebagai pengganti kelompok kontrol negatif (udara). Pemilihan pembawa yang tepat didasarkan pada uji pendahuluan yang dilakukan atau data penelitian sebelumnya. Penggunaan kelompok kontrol negatif bersama-sama dengan kelompok kontrol pembawa dianjurkan jika toksisitas pembawa tidak diketahui. Namun jika pembawa diketahui tidak toksik, maka dapat digunakan hanya kelompok kontrol pembawa. Jika uji pendahuluan (*range-finding study*) terhadap sediaan uji yang diformulasikan dalam pembawa tidak menunjukkan toksisitas, maka pembawa tersebut aman pada konsentrasi yang diuji dan kelompok kontrol pembawa harus digunakan.

6.c.3. Pemberian Sediaan Uji

Pengaturan pajanan inhalasi dilakukan melalui bejana inhalasi pada hidung atau *nose only* (mencakup kepala, hidung atau moncong) atau

seluruh tubuh (*whole-body*). Pemajanan sediaan uji melalui inhalasi pada tikus dilakukan dalam durasi 6 jam. Justifikasi harus diberikan saat menggunakan durasi pajanan kurang dari 6 jam/hari, atau jika diperlukan pajanan inhalasi pada seluruh tubuh (*whole*-body) dengan durasi lama (misalnya 22 jam/hari).

6.c.4. Bejana Inhalasi

Pengujian selalu dilakukan pada bejana inhalasi yang dinamis. Penggunaan bejana inhalasi statis yang tidak memiliki aliran udara tidak dapat diterima. Sifat sediaan uji dan tujuan pengujian harus dipertimbangkan saat memilih bejana inhalasi. Pajanan bejana *nose-only* umumnya dipilih untuk sediaan uji yang berupa aerosol cair atau padat dan uap yang dapat mengembun membentuk aerosol. Namun untuk tujuan tertentu dapat menggunakan mode pajanan seluruh tubuh (*whole-body*) dengan justifikasi. Pada penggunaan bejana seluruh tubuh, untuk memastikan stabilitas atmosfer maka volume total hewan uji tidak boleh melebihi 5% dari volume bejana.

Pakan tidak boleh diberikan selama periode pemajanan kecuali pemajanan lebih dari 6 jam, sedangkan air dapat diberikan jika mode pajanan dilakukan melalui inhalasi bejana seluruh tubuh (*whole-body*).

6.c.5. Uji Pendahuluan (*range-finding study*)

Uji pendahuluan (*range-finding study*) dilakukan untuk memperoleh informasi terkait pemilihan tingkatan konsentrasi pada uji utama dan informasi tambahan untuk memperkuat uji utama terutama untuk sediaan uji aerosol padat yang sulit larut. Informasi lain yang diperoleh dari uji pendahuluan antara lain informasi tentang metode analisis; distribusi ukuran partikel; toksisitas sistemik; toksikokinetik; kelarutan sediaan uji di paru; translokasi partikel; temuan mekanisme toksik; patologi klinis (hematologi dan biokimia darah); histopatologi; biomarker cedera paru; sensitivitas gender; data *bronchoalveolar lavage fluid* (BALF); dan perkiraan konsentrasi yang tidak menimbulkan efek toksik (NOAEC), konsentrasi terendah yang dapat menimbulkan efek toksik (LOAEC), konsentrasi tolerasi maksimum atau *maximum tolerated concentration* (MTC), dan/atau konsentrasi acuan dalam uji utama. Analisis BALF dilakukan pada

saat pajanan selesai dan secara berkala selama periode pasca pajanan. Pada pengujian sediaan aerosol padat, pemeriksaan kelarutan sediaan uji dan beban paru (*lung burden*) pasca pajanan dilakukan untuk memperoleh informasi tentang durasi periode pasca pajanan pada uji utama dan jarak titik waktu observasi pasca pajanan atau *post-exposure observation* (PEO). Selain itu, juga dapat dilakukan pengukuran beban kelenjar getah bening terkait paru (*lung-associated lymph node* atau LALN). Pemeriksaan LALN dapat memberikan informasi tentang translokasi atau perpindahan dari partikel sediaan uji yang sulit larut yang tertahan di paru-paru ke organ lain.

Uji pendahuluan dilakukan pada 1 (satu) atau lebih tingkat konsentrasi dan kelompok kontrol. Hewan uji yang digunakan biasanya tidak lebih dari 5 hewan jantan dan 5 hewan betina pada tiap tingkatan konsentrasi. Lama uji pendahuluan yaitu:

a. Uji Toksisitas Subkronis Singkat Inhalasi 28 hari

Berlangsung minimal 5 hari dan umumnya tidak lebih dari 14 hari serta dapat mencakup periode pasca pemajanan. Pada pengujian terhadap partikel yang sulit larut, mungkin diperlukan waktu pengujian lebih dari 14 hari untuk pemeriksaan yang akurat terhadap uji kelarutan kimiawi dan beban paru.

b. Uji Toksisitas Subkronis Inhalasi 90 hari

Berlangsung minimal 5 hari dan umumnya tidak lebih dari 28 hari serta dapat mencakup periode pasca pemajanan. Pada pengujian terhadap partikel yang sulit larut, mungkin diperlukan waktu pengujian lebih dari 28 hari untuk pemeriksaan yang akurat terhadap uji kelarutan kimiawi dan beban paru.

6.c.6. Uji Utama

Berdasarkan sifat sediaan ujinya, uji utama dibedakan menjadi 2 desain uji yaitu opsi A untuk sediaan uji berupa gas, uap, aerosol, atau campurannya; dan opsi B untuk sediaan uji yang sulit larut yang berpotensi tertahan di paru-paru. Skema untuk opsi A dan B ditunjukkan dalam Bab IV huruf XX, YY, ZZ dan AAA. Uji utama terdiri dari sekurang-kurangnya digunakan 3 kelompok konsentrasi yang berbeda, 1 kelompok kontrol dan/atau kontrol pembawa. Bila diperlukan, ditambahkan kelompok satelit (kelompok dosis tinggi dan

kelompok kontrol) dan kelompok interim (pada kontrol dan semua dosis).

a. Uji Toksisitas Subkronis Singkat Inhalasi 28 hari

Setiap kelompok terdiri dari minimal 5 hewan per jenis kelamin yang diberi pajanan inhalasi umumnya 6 jam per hari selama 7 hari per minggu selama periode 4 minggu (total durasi uji minimal 28 hari). Justifikasi harus diberikan saat menggunakan durasi pajanan kurang dari 6 jam/hari, atau jika diperlukan pajanan inhalasi pada seluruh tubuh dengan durasi lama (misalnya 22 jam/hari).

b. Uji Toksisitas Subkronis Inhalasi 90 hari

Setiap kelompok terdiri dari minimal 10 hewan per jenis kelamin yang diberi pajanan inhalasi umumnya 6 jam per hari selama 7 hari per minggu selama periode 13 minggu (total durasi uji minimal 90 hari). Justifikasi harus diberikan saat menggunakan durasi pajanan kurang dari 6 jam/hari, atau jika diperlukan pajanan inhalasi pada seluruh tubuh dengan durasi lama (misalnya 22 jam/hari).

Jika diperlukan pengamatan interim selama periode pajanan uji utama maka jumlah hewan di setiap tingkat konsentrasi harus ditambah sebanyak jumlah hewan yang akan dikorbankan pada waktu interim. Pemilihan tingkat konsentrasi pada uji utama harus memungkinkan identifikasi organ target dan menunjukkan gambaran respon konsentrasi yang jelas, yaitu:

a. Tingkat konsentrasi tinggi harus menghasilkan tingkat toksisitas yang nyata tetapi tidak menyebabkan kematian atau tanda-tanda persisten yang dapat menyebabkan kematian atau mencegah perubahan hasil yang berarti
b. Tingkat konsentrasi sedang harus menghasilkan perubahan bertahap dari efek toksik antara konsentrasi rendah dan tinggi
c. Tingkat konsentrasi rendah (NOAEC) harus menimbulkan sedikit atau tidak ada efek toksik.

6.c.7. Pengamatan

Hewan uji diobservasi secara klinis setiap individual sebelum, selama, dan setelah periode pajanan serta selama periode pasca-pajanan. Pengamatan yang lebih sering dapat dilakukan tergantung pada respon hewan selama pajanan. Jika pengamatan hewan terhalangi oleh: penggunaan tabung penahan (*restraint tubes*); bejana seluruh tubuh yang kurang terang; atau atmosfer bejana yang tidak tembus cahaya maka hewan harus diamati dengan cermat setelah pajanan. Pengamatan sebelum pajanan hari berikutnya dapat menilai reversibilitas atau eksaserbasi efek toksik. Pengamatan selama periode pasca-pajanan setidaknya dilakukan sekali sehari. 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.

Pengamatan yang dilakukan termasuk pada: kulit, bulu, mata, membran mukosa dan juga sistem pernafasan, sistem syaraf otonom, sistem syaraf pusat, aktivitas somatomotor serta tingkah laku. Selain itu, perlu juga pengamatan pada kondisi: gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, tidur, dan koma. Pengukuran suhu rektal dapat dilakukan untuk memberikan bukti pendukung terhadap gejala refleks bradipnea, refleks paintal, atau hipo/hipertermia terkait dengan pengujian atau pengurungan hewan dalam kandang. Pemeriksaan tambahan dapat dimasukkan dalam protokol pengujian seperti biomonitoring (pengumpulan urin/feses), pemeriksaan fungsi paru, dan perubahan perilaku.

6.c.8. Monitoring Berat Badan dan Konsumsi pakan

Berat badan masing-masing hewan harus dimonitor selama periode aklimatisasi; pada saat sebelum pemajanan pertama (hari ke 0); 2 kali setiap minggu setelahnya dan pada saat kematian atau eutanasia. Jika tidak ada efek berat badan yang signifikan dalam 2 minggu pertama pada uji toksisitas subkronis singkat 28 hari atau 4 minggu pada uji toksisitas subkronis 90 hari, maka selanjutnya berat badan dapat diukur setiap minggu selama sisa waktu pengujian. Jika terdapat periode pasca pajanan maka hewan harus ditimbang setiap minggu. Pada akhir penelitian, hewan yang masih bertahan hidup

ditimbang dan kemudian dikorbankan. Konsumsi pakan harus diukur setiap minggu dan konsumsi air juga dapat diukur. Pengukuran dilakukan sampai periode pasca pajanan.

6.c.9. Pemeriksaan Patologi Klinis

Pada akhir durasi pajanan dan fase pemulihan, pemeriksaan patologi klinis dilakukan untuk seluruh hewan pada kelompok uji dan kelompok kontrol selama periode pajanan dan pasca pajanan serta saat hewan dikorbankan. Pemeriksaan patologi tidak perlu dilakukan pada kelompok satelit yang digunakan untuk pengukuran beban paru, tetapi jika dianggap dapat membantu dalam memahami toksisitas (termasuk pemulihan), parameter yang dipilih dapat dilakukan pemeriksaan pada PEO-2 dan PEO-3. Interval waktu antara akhir pajanan dan pengambilan darah harus dicatat. Pengambilan sampel setelah akhir pemajanan diindikasikan untuk parameter dengan waktu paruh plasma pendek (misalnya COHb, CHE, MetHb).

a. 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 K dan L atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

b. Pemeriksaan Biokimia Klinis

   Pemeriksaan biokimia klinis meliputi: glukosa, alanine aminotransferase, total kolesterol, aspartat aminotransferase, trigliserida, alkalin fosfatase, nitrogen urea darah, kalium, total bilirubin, natrium, kreatinin, kalsium, total protein, fosfor, albumin, klorida dan globulin. 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.

   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 M - BB atau sesuai dengan metode yang valid dan sahih.

Urinalisis rutin tidak diperlukan, tetapi dapat dilakukan jika bermanfaat berdasarkan toksisitas yang diperkirakan atau diamati. Parameter urinalisis yang dapat diamati meliputi: penampilan (warna dan kekeruhan), total protein, volume, glukosa, gravitasi spesifik atau osmolalitas, darah / sel darah pH. Peneliti dapat memilih pemeriksaan parameter tambahan untuk lebih mengkarakterisasi toksisitas sediaan uji, seperti: kolinesterase, lipid, hormon, keseimbangan asam/basa, methaemoglobin atau *Heinz bodies*, kreatin kinase, sitologi sumsum tulang, troponin, laktat dehidrogenase, glutamat dehidrogenase, dan *gamma glutamyl transpeptidase*.

6.c.10. *Bronchoalveolar Lavage Fluid* (BALF)

Pada opsi A, *bronchoalveolar lavage* harus dilakukan di PEO-1 (dalam 24 jam saat penghentian pajanan) dan pada satu interval pasca pajanan (PEO-2); sedangkan pada opsi B, BALF harus dilakukan di PEO-1 (dalam 24 jam setelah penghentian pajanan) pada kedua jenis kelamin dan jika terdapat kelompok pemulihan maka pada hewan betina di PEO-2 (lihat Bab IV huruf AAA). BALF pada umumnya menggunakan paru-paru kanan. Analisis wajib BALF mencakup parameter berikut:

- Laktat dehidrogenase (LDH)
- Total protein atau albumin
- Jumlah dan diferensiasi sel untuk makrofag alveolar, limfosit, neutrofil, dan eosinofil

6.c.11. Pemeriksaan Beban Paru

Beban paru merupakan jumlah sediaan uji yang terdapat di paru-paru pada titik waktu tertentu karena tingkat pajanan yang berlebihan dan/atau mekanisme pembersihan yang berlebihan. Pengukuran beban paru harus dilakukan pada pajanan berulang sediaan aerosol padat yang sulit larut dengan tujuan untuk mengetahui dosis yang menyebabkan sediaan uji tertahan di paru-paru dan membantu memahami toksisitas sediaan uji. Pengukuran beban paru dilakukan pada uji pendahuluan atau jika terdapat informasi relevan lainnya yang menunjukkan bahwa sediaan uji akan atau mungkin tertahan di

paru-paru, serta bila tersedia metode analisis yang sesuai. Pengukuran beban paru dilakukan pada hewan jantan karena memiliki volume udara yang dihirup atau dikeluarkan dari paru-paru dalam satu menit (*minute volume*) lebih tinggi daripada betina sehingga dapat memiliki beban paru yang lebih besar.

Seperti yang ditunjukkan pada Bab IV huruf AAA (opsi B), kelompok satelit yang terdiri dari 5 hewan jantan per konsentrasi ditambahkan pada uji utama untuk pengukuran beban paru saat penghentian pajanan (PEO-1). PEO-1 dijadwalkan kira-kira 24 jam setelah penghentian pajanan untuk memungkinkan pembersihan/*clearance* cepat dari sediaan uji yang tersimpan di saluran udara melalui transpor mukosiliari.

Peneliti memiliki pilihan untuk mengukur beban paru dalam kelompok satelit pemulihan di PEO-2 dan PEO-3. Untuk mendapatkan informasi yang jelas tentang kinetika pembersihan paru paru yang sama (disarankan menggunakan paru kanan) harus dilakukan pengukuran beban paru di semua titik waktu pasca pajanan. Durasi periode pasca pajanan serta jarak waktu antar PEO ditentukan dari hasil uji pendahuluan dan informasi relevan lainnya yang tersedia.

6.c.12. Pemeriksaan Oftalmologi

Pemeriksaan oftalmologi pada fundus, media refraksi, iris, dan konjungtiva harus dilakukan untuk semua hewan sebelum pemberian sediaan uji; dan untuk semua kelompok konsentrasi tinggi dan kelompok kontrol pada akhir uji utama. Pemeriksaan dilakukan menggunakan oftalmoskop atau alat lain yang ekuivalen. Jika perubahan pada mata terdeteksi maka semua hewan dalam kelompok lain termasuk kelompok satelit harus dilakukan pemeriksaan.

6.c.13. Pemeriksaan Makropatologi

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

6.c.14. Pemeriksaan Histopatologi

Seluruh hewan (termasuk yang mati selama penelitian maupun yang dimatikan) harus dilakukan nekropsi. Waktu antara pajanan terakhir

dengan pengorbanan setiap hewan harus dicatat. Nekropsi harus dilakukan sesegera mungkin, biasanya dalam satu atau dua hari. Jika nekropsi tidak dapat dilakukan segera setelah hewan mati maka hewan tersebut harus disimpan dalam lemari pendingan pada suhu yang cukup rendah (tidak dibekukan) untuk meminimalkan autolisis. Semua perubahan patologi dicatat untuk setiap hewan uji terutama setiap perubahan pada saluran pernapasan. Organ dan jaringan yang harus diawetkan selama nekropsi untuk pemeriksaan histopatologi.

a. Uji Toksisitas Subkronis Singkat Inhalasi 28 hari

Pemeriksaan histopatologi uji toksisitas subkronis singkat inhalasi 28 hari meliputi semua lesi makropatologi, adrenal, bulba olfaktorius, sumsum tulang, ovarium, otak (termasuk bagian serebrum, serebelum dan medulla), vesikula seminalis, [*mata (retina, saraf optik) dan kelopak mata*], sumsum tulang belakang (servikal, mid-toraks, dan lumbar), jantung, limpa, ginjal, lambung, laring, testis, hati, timus, paru-paru, tiroid, kelenjar getah bening, trakea, kandung kemih, jaringan nasofaring, uterus, esofagus, dan semua lesi kasar, atau sekurang-kurangnya 5 organ utama yaitu hati, limpa, jantung, ginjal, paru dan ditambah organ sasaran yang diketahui secara spesifik.

b. Uji Toksisitas Subkronis Inhalasi 90 hari

Pemeriksaan histopatologi uji toksisitas subkronis inhalasi 90 hari meliputi semua lesi makropatologi adrenal, otak (termasuk bagian serebrum, serebelum, dan medulla/pons), ovarium, epididimis, jantung, ginjal, hati, limpa, paru-paru, testis, timus, tiroid, uterus, esofagus, aorta, bulba olfaktorius, [*mata (retina, saraf optik) dan kelopak mata*], sumsum tulang, saraf tulang belakang, pankreas, paratiroid, sekum, saraf tepi, limfonodus, kelenjar koagulasi, [*kelenjar harderian*], [*kelenjar lakrimal (ekstraorbital*)], kelenjar mamari, [*lidah*], jaringan nasofaring, laring, trakhea, gigi, kolon, duodenum, rektum, ileum, jejunum,stenum, lambung, prostat, pitutari, kelenjar saliva, femur, kantung kemih, femur dan persendian, vesikel seminal, kulit, [*ureter*], [*uretra*], vagina, dan semua lesi kasar, atau sekurang-kurangnya 5 organ utama yaitu hati, limpa, jantung, ginjal, paru dan ditambah organ sasaran yang diketahui secara spesifik.

Pengawetan organ dan jaringan [dalam tanda kurung dan miring] serta organ dan jaringan lainnya diserahkan kepada peneliti. Organ yang dicetak tebal harus dipotong dan ditimbang basah secepat mungkin setelah pembedahan untuk menghindari pengeringan. Jaringan dan organ harus fiksasi dalam 10% buffer formalin atau fiksatif lain yang sesuai segera setelah nekropsi dilakukan, dan tidak kurang dari 24-48 jam sebelum pemotongan tergantung pada fiksatif yang akan digunakan.

Paru-paru kiri harus diawetkan untuk evaluasi histopatologi dan paru-paru kanan digunakan untuk analisis BALF. Paru-paru kiri harus diangkat utuh, ditimbang dan direndam sempurna dengan larutan fiksatif yang sesuai untuk memastikan struktur paru-paru tetap terjaga. Jika desain pengujian mencakup penggunaan kelompok satelit untuk pengukuran beban paru maka kedua paru dapat ditimbang.
Jika diperlukan pemeriksaan translokasi sediaan uji untuk mengetahui pengendapan atau beban partikel dari sediaan uji yang sulit larut dalam organ tertentu maka dapat dilakukan pengukuran beban kelenjar getah bening terkait paru (*lung-associated lymph node* (LALN).

Pemeriksaan histopatologi dari semua organ dan jaringan yang tercantum dilakukan untuk kelompok kontrol dan kelompok konsentrasi tinggi serta untuk semua hewan yang mati atau dikorbankan selama pengujian. Pemeriksaan histopatologi untuk kelompok konsentrasi tambahan dapat dilakukan untuk menunjukkan respons konsentrasi yang lebih jelas. Jika terdapat kematian awal yang berlebihan atau masalah lain dalam kelompok konsentrasi tinggi yang mengganggu signifikansi data maka kelompok konsentrasi yang lebih rendah berikutnya harus diperiksa secara histopatologi. Pemeriksaan histopatologi terutama dilakukan pada saluran pernapasan, organ target dan lesi yang parah. Organ dan jaringan yang mengalami lesi pada kelompok konsentrasi tinggi harus diperiksa pada semua kelompok. Ketika kelompok satelit pemulihan digunakan maka pemeriksaan histopatologi harus dilakukan pada semua jaringan dan organ yang diidentifikasi menunjukkan efek pada

kelompok perlakuan. Pemeriksaan histopatologi untuk kelompok satelit yang digunakan untuk pengukuran beban paru dapat dipertimbangkan. Pemeriksaan histopatologi direkomendasikan dilakukan pada paru-paru kiri. Perlu dibuat korelasi antara pengamatan makropatologi dengan temuan histopatologi.

6.c.15. Fungsi Paru

Jika ditemukan adanya refleks bradipnea atau refleks paintal pada hewan rodensial dalam uji pendahuluan atau informasi lain (misalnya, hipotermia) yang menunjukkan bahwa dapat terjadi refleks tersebut, maka tingkat refleks harus diukur dalam uji utama dengan mengukur fungsi paru dan suhu tubuh secara berkala.

6.c.16. Pengumpulan dan Analisis Data

a. Data

Data masing-masing hewan harus tersedia baik pada uji pendahuluan maupun uji utama, dan semua data harus diringkas dalam bentuk tabel yang menunjukkan untuk setiap kelompok uji: jumlah hewan 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 efek toksik dan waktu efek toksik; waktu terjadinya reaksi kesembuhan/reversibilitas; dan penemuan nekropsi.

b.Pelaporan hasil Pengujian

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Tinjauan Pustaka
3. Metode
   a. Hewan: jumlah, umur, jenis kelamin, metode pengacakan dan spesies/galur yang digunakan serta justifikasi penggunaan spesies selain tikus
   b. Sediaan uji: sifat fisik; kemurnian; sifat fisika-kimia; informasi karakterisasi tambahan yang relevan dengan partikulat, khususnya material nano; identifikasi dan CAS No. (jika ada)

c. Zat pembawa: justifikasi penggunaan dan pemilihan pembawa, data historis atau penggunaan bersamaan yang menunjukkan bahwa pembawa tidak mengganggu hasil penelitian
d. Bejana inhalasi: deskripsi; volume; sumber dan peralatan untuk pajanan pada hewan; alat untuk mengukur suhu, kelembaban, ukuran partikel dan konsentrasi analitik; metode kalibrasi peralatan untuk memastikan homogenitas atmosfer uji; perbedaan tekanan (positif/negatif); port pajanan per ruang (hanya hidung); lokasi hewan uji di dalam ruangan (seluruh tubuh); stabilitas atmosfer uji; lokasi sensor suhu, kelembaban dan pengambilan sampel atmosfer dalam bejana; pengaturan suplai udara; laju aliran udara; waktu untuk mencapai keseimbangan bejana inhalasi (t_{95}); jumlah perubahan volume per jam; perangkat pengukur (jika ada)
e. Data pajanan: pemilihan konsentrasi target dalam uji utama; konsentrasi nominal (massa total sediaan uji yang dihasilkan dalam bejana inhalasi dibagi dengan volume udara yang melewati bejana); konsentrasi analitik dari zona pernafasan hewan uji; distribusi ukuran partikel; *mass median aerodynamic diameter* (MMAD); deviasi standar geometris (σg) termasuk metode penghitungannya
f. Kondisi pemeliharaan hewan: deskripsi kondisi kandang, jumlah hewan per kandang, suhu dan kelembaban relatif kandang, pakan dan air, deskripsi pengkondisian pra uji, pemeriksaan oftalmologi, pengobatan penyakit
g. Kondisi pengujian: penyiapan sediaan uji, alasan pemilihan konsentrasi awal, peralatan yang digunakan, pemberian sediaan uji, metode analisa kimia yang digunakan dan validasi metode

4. Hasil
   a. Data suhu, kelembaban dan aliran udara
   b. Data konsentrasi target bejana, nominal dan analitik
   c. Data distribusi ukuran partikel dan perhitungan MMAD dan σg
   d. Data respon-tingkat konsentrasi setiap hewan

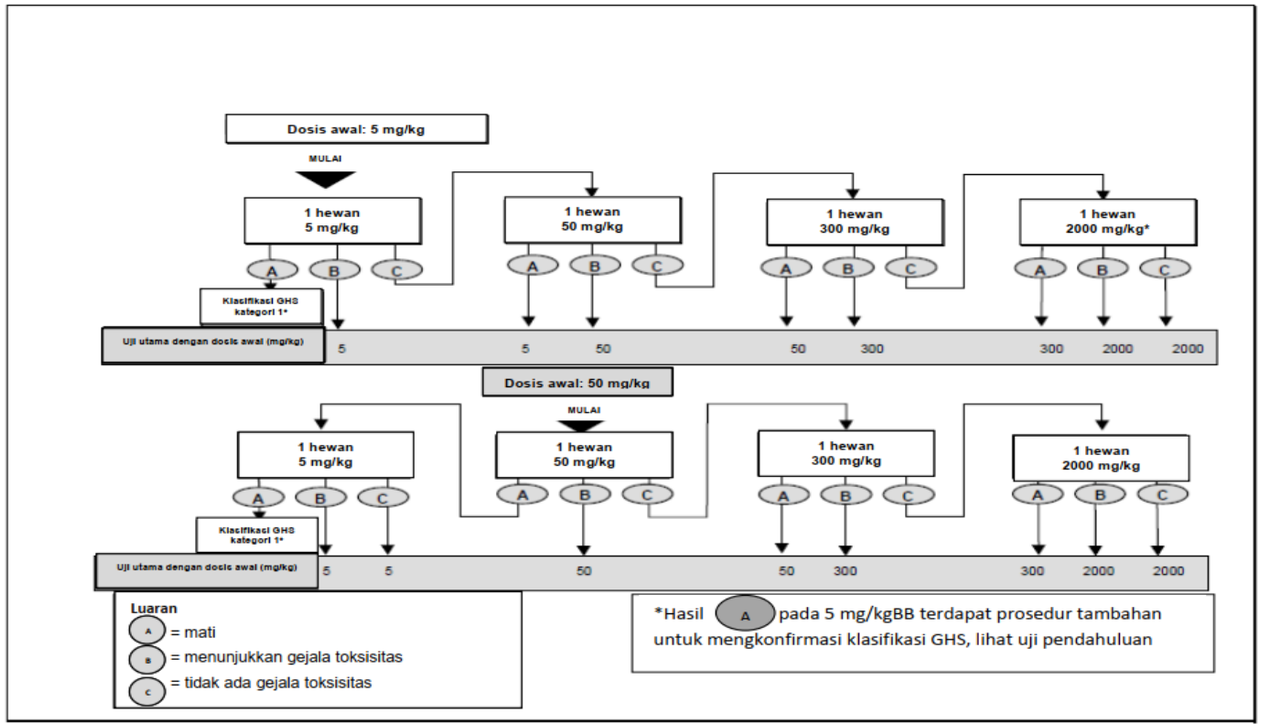
e. Data berat badan
f. Data konsumsi pakan
g. Data patologi klinis
h. Data analisis bronchoalveolar lavage fluid (BALF)
i. Data beban paru, jika ada,
j. Data fungsi paru dan suhu tubuh, jika ada
k. Data berat organ, makropatologi dan temuan histopatologi, jika ada
l. Efek toksik yang terjadi untuk setiap konsentrasi dan jenis kelamin
m. Waktu terjadinya gejala-gejala toksik, tingkah laku hewan dan kematian

5. Pembahasan
6. Kesimpulan
7. Daftar Pustaka

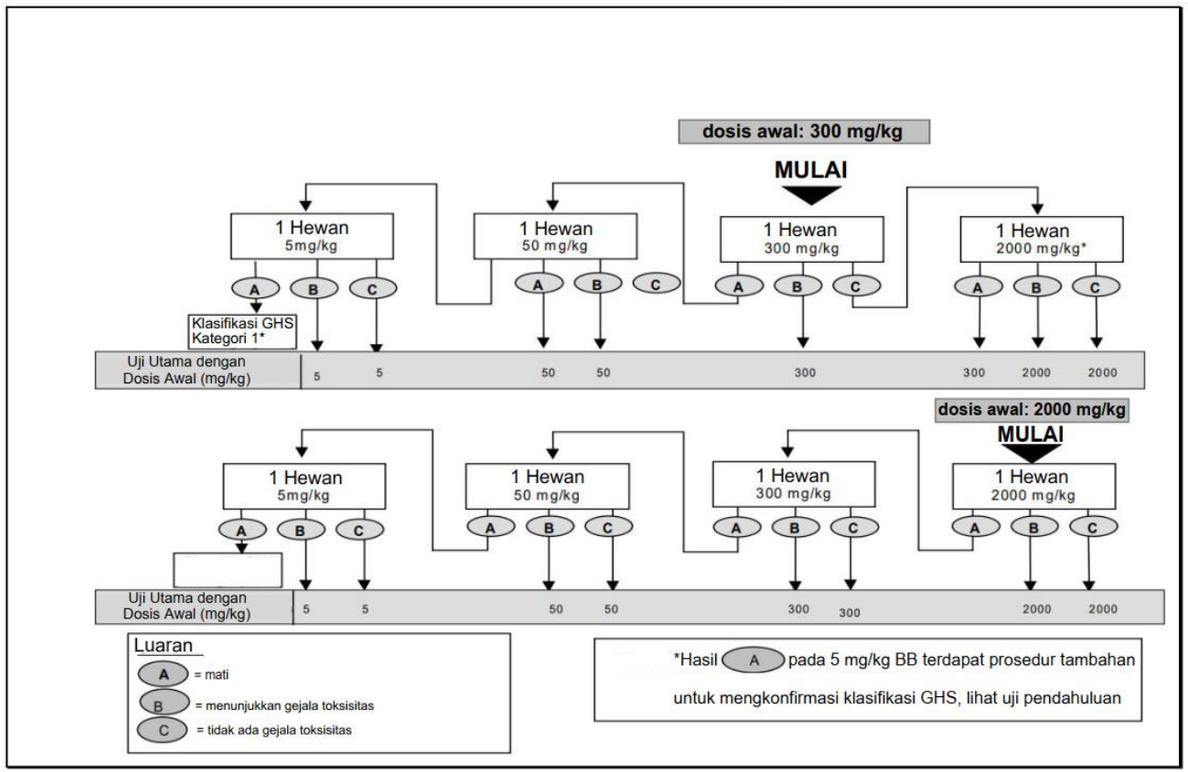
BAB IV
PENJELASAN TEKNIS UJI TOKSISITAS PRAKLINIK SECARA IN VIVO

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 sahih, misalnya pada penetapan kadar pemeriksaan parameter biokimia klinis dapat disesuaikan dengan alat dan bahan yang digunakan sesuai dengan petunjuk pada *Manufacturing Procedure.*

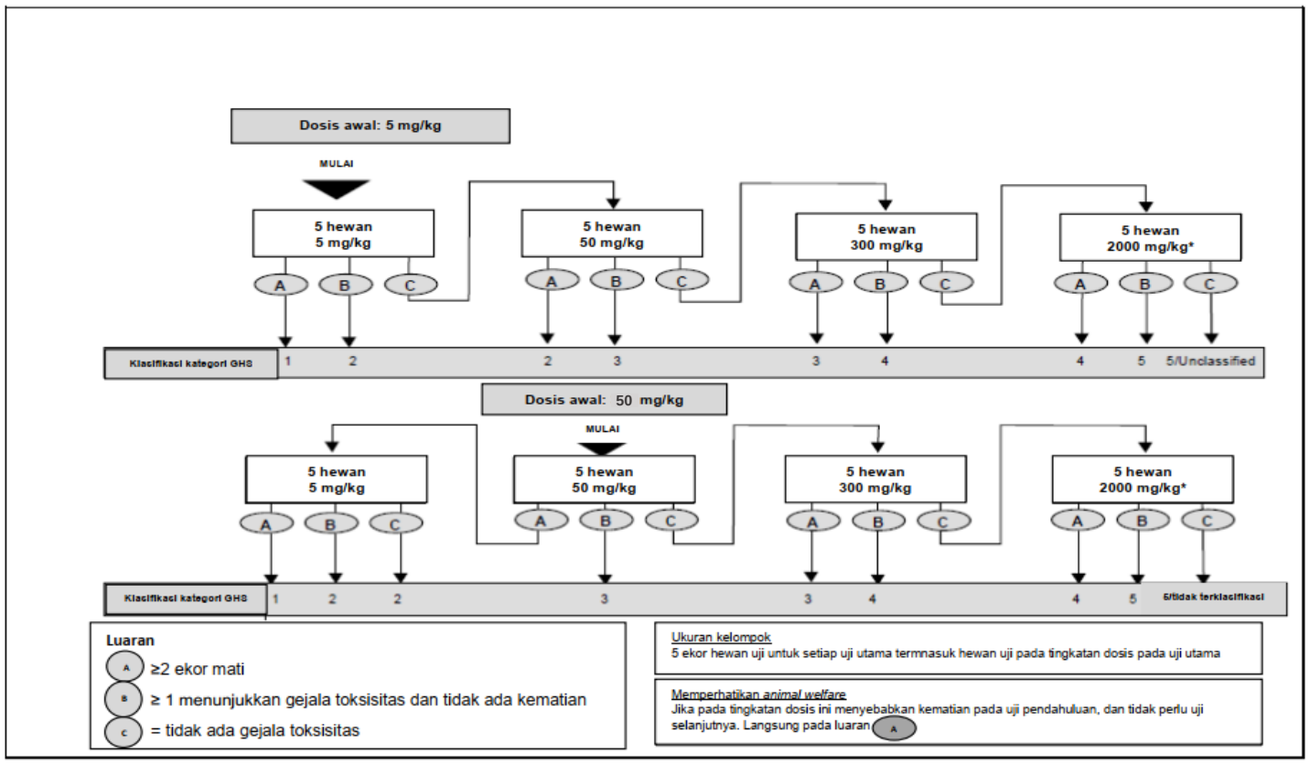
A. Bagan uji pendahuluan dengan *starting dose* 5 dan 50 mg/kg berat badan pada uji toksisitas akut oral *Fixed Dose Procedure Method* (OECD, 2001)



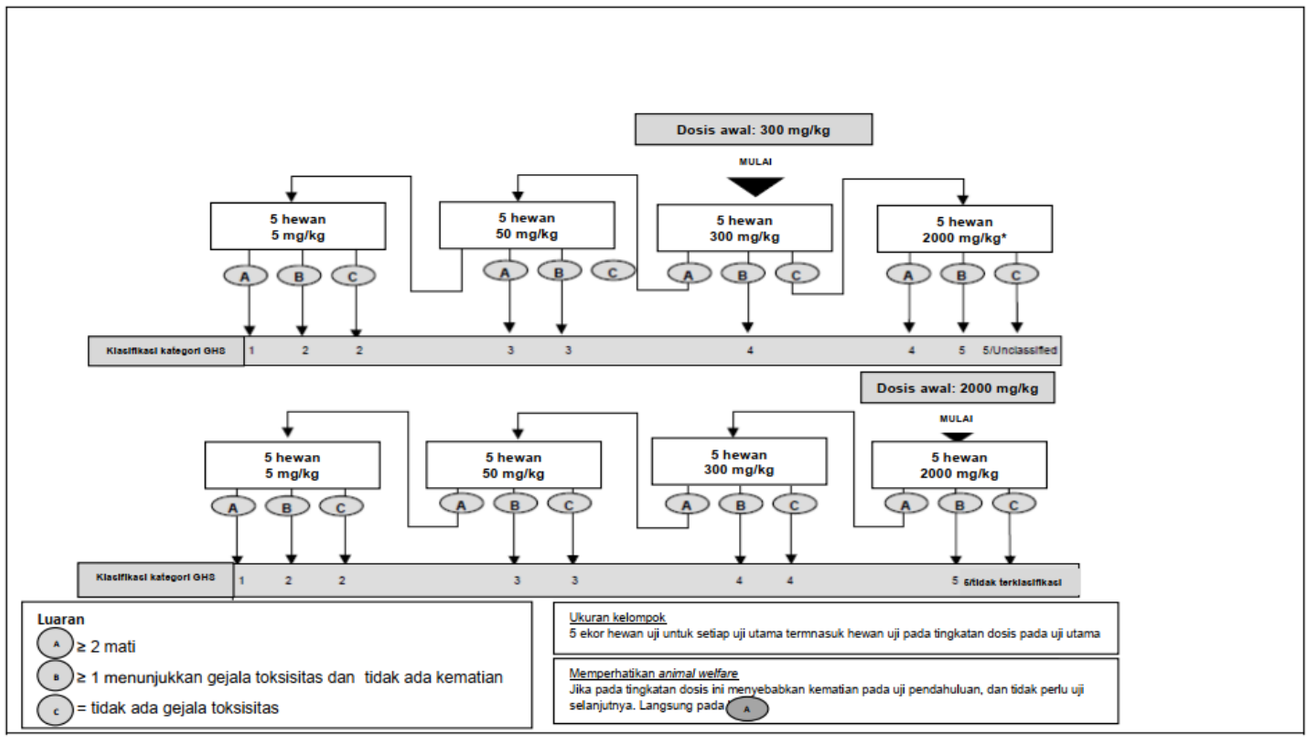
B. Bagan uji pendahuluan dengan *starting dose* 300 dan 2000 mg/kg berat badan pada uji toksisitas akut oral *Fixed Dose Procedure Method* (OECD, 2001)



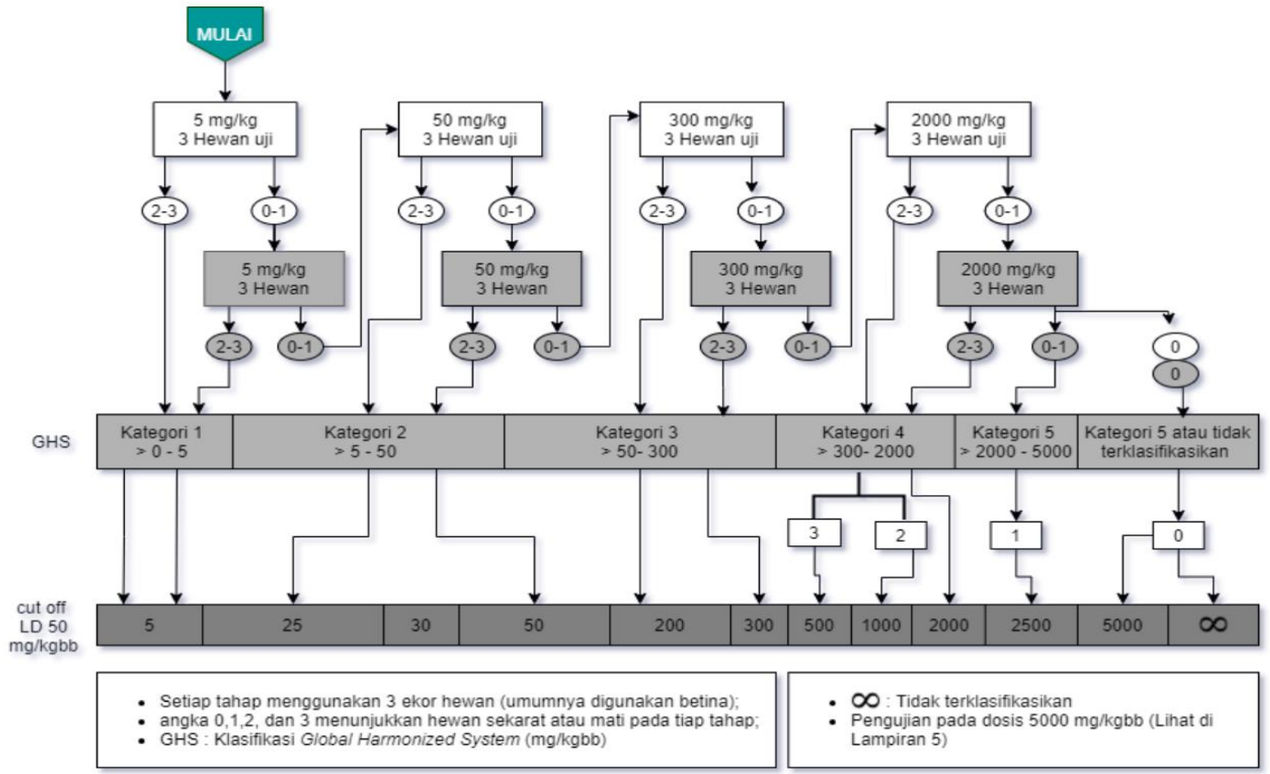
c. **Bagan uji utama dengan *starting dose* 5 dan 50 mg/kg berat badan pada uji toksisitas akut oral *Fixed Dose Procedure Method* (OECD, 2001)**



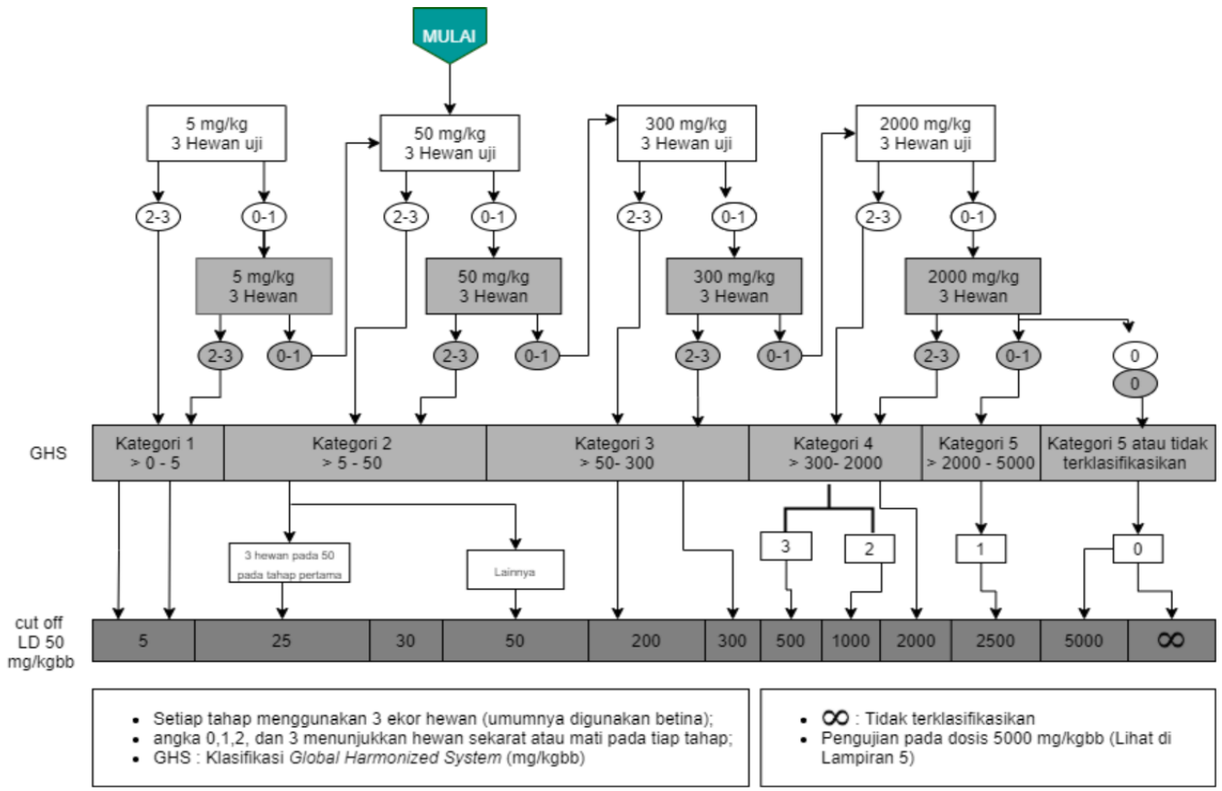
D. Bagan uji utama dengan *starting dose* 300 dan 2000 mg/kg berat badan pada uji toksisitas akut oral *Fixed Dose Procedure Method* (OECD, 2001)



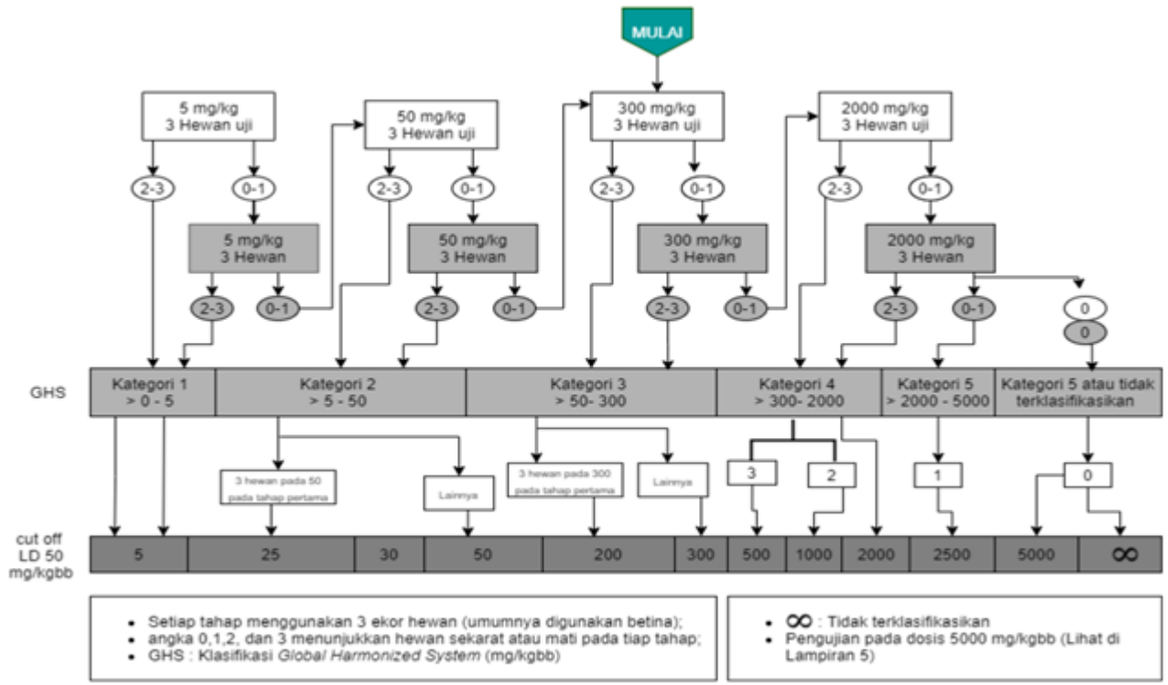
E. Bagan uji dengan *starting dose* 5 mg/kg berat badan pada uji toksisitas akut oral *Acute Toxic Class Method* (OECD, 2001)



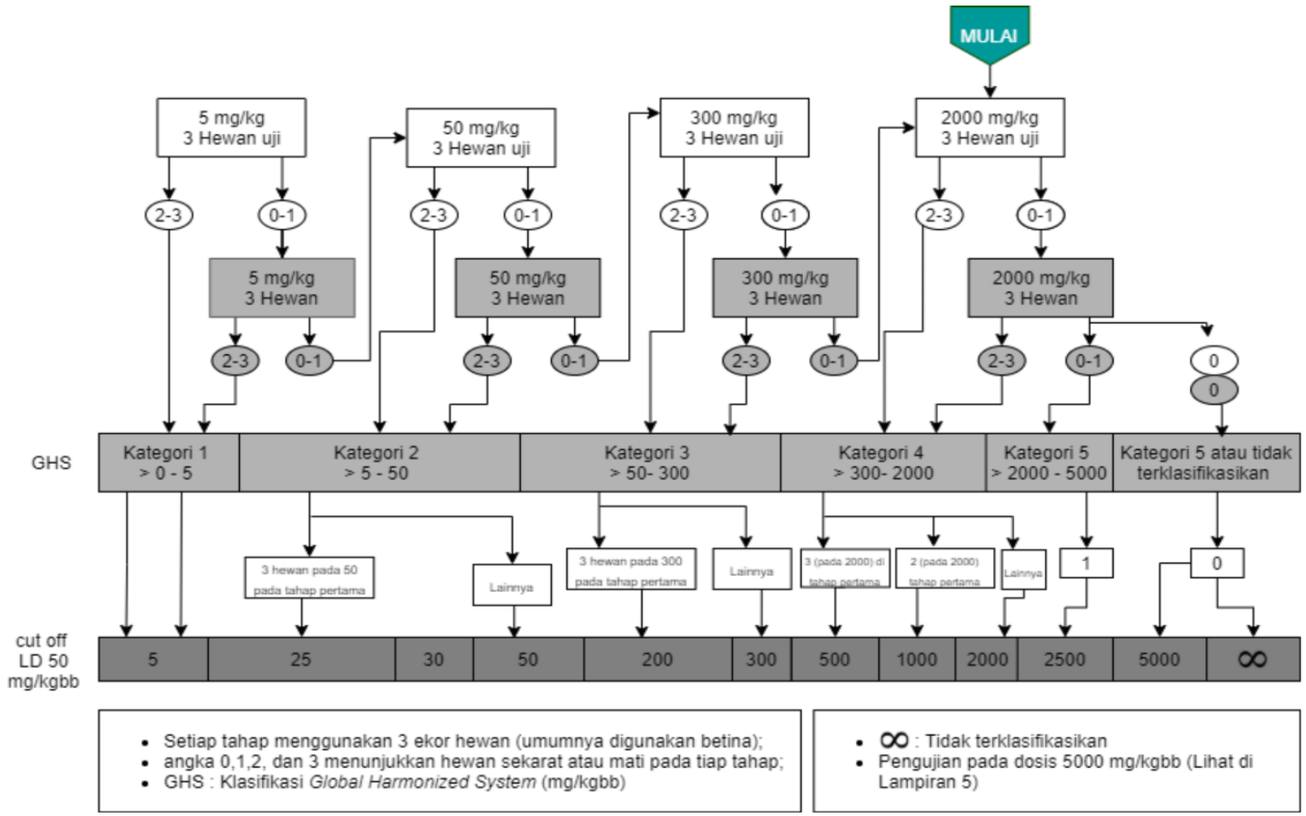
F. Bagan uji dengan *starting dose* 50 mg/kg berat badan pada uji toksisitas akut oral *Acute Toxic Class Method* (OECD, 2001)



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



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



I. Progresi Dosis pada uji toksisitas akut oral *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*
							0.24	0.23
					0.275	0.26		
				0.31			0.34	0.31
			0.375			0.375		
								0.41
					0.44		0.47	
		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	1.75
							2.4	2.3
					2.75	2.6		
				3.1			3.4	3.1
			3.75			3.75		
					4.4			4.1
							4.7	
		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	17.5
							24	23
					27.5	26		
				31			34	31

Table 1 continued

Slope =	1	2	3	4	5	6	7	8
			37.5			37.5		
					44			41
							47	
		55		55		55		55
							65	
					69			73
			81			82		
				99			91	97
					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		550
							650	
					690			730
			810			820		
				990			910	970
					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. Pembagian jumlah hewan uji per kelompok pada uji toksisitas subkronis dan kronis oral

Uji Toksisitas Subkronis 14 hari

Kelompok	Jumlah Hewan Uji	Waktu Pengamatan	
		Utama (14 hari)	Satelit (14 + 7 hari)
Kontrol			
Kontrol jantan	5	5	
Kontrol betina	5	5	
Dosis rendah			
Dosis rendah jantan	5	5	
Dosis rendah betina	5	5	
Dosis tengah			
Dosis tengah jantan	5	5	
Dosis tengah betina	5	5	
Dosis tinggi			
Dosis tinggi jantan	5	5	
Dosis tinggi betina	5	5	
Satelit kontrol			
Satelit kontrol jantan	5		5
Satelit kontrol betina	5		5
Satelit dosis tinggi			
Satelit dosis tinggi jantan	5		5
Satelit dosis tinggi betina	5		5
Jumlah	60		

Uji Toksisitas Subkronis Oral 28 hari

Kelompok	Jumlah Hewan Uji	Waktu Pengamatan	
		Utama (28 hari)	Satelit (28 + 14 hari)
Kontrol jantan	5	5	
Kontrol betina	5	5	
Dosis rendah jantan	5	5	
Dosis rendah betina	5	5	
Dosis tengah jantan	5	5	
Dosis tengah betina	5	5	
Dosis tinggi			
Dosis tinggi jantan	5	5	
Dosis tinggi betina	5	5	
Satelit kontrol jantan	5		5
Satelit kontrol betina	5		5
Satelit dosis tinggi jantan	5		5
Satelit dosis tinggi betina	5		5
Jumlah	60		

Uji Toksisitas Subkronis Oral 90 hari

Kelompok	Jumlah Hewan Uji	Waktu Pengamatan	
		Utama (90 hari)	Satelit (90 + 28 hari)
Kontrol jantan	10	10	
Kontrol betina	10	10	
Dosis rendah jantan	10	10	
Dosis rendah betina	10	10	
Dosis tengah jantan	10	10	
Dosis tengah betina	10	10	
Dosis tinggi			
Dosis tinggi jantan	10	10	
Dosis tinggi betina	10	10	
Satelit kontrol jantan	5		5
Satelit kontrol betina	5		5
Satelit dosis tinggi jantan	5		5
Satelit dosis tinggi betina	5		5
Jumlah	100		

Uji Toksisitas Kronis 9 bulan

Kelompok	Jumlah Hewan Uji	Waktu Pengamatan		
		Ad Interim (6 bulan)	Utama (9 bulan)	Satelit (9 bulan + 28 hari)
Kontrol				
Kontrol jantan	20	10	10	
Kontrol betina	20	10	10	
Dosis rendah				
Dosis rendah jantan	20	10	10	
Dosis rendah betina	20	10	10	
Dosis tengah				
Dosis tengah jantan	20	10	10	
Dosis tengah betina	20	10	10	
Dosis tinggi				
Dosis tinggi jantan	20	10	10	
Dosis tinggi betina	20	10	10	
Satelit kontrol				
Satelit kontrol jantan	5			5
Satelit kontrol betina	5			5
Satelit dosis tinggi				
Satelit dosis tinggi jantan	5			5
Satelit dosis tinggi betina	5			5
Jumlah	180			

Uji Toksisitas Kronik Oral 12 bulan

Kelompok	Jumlah Hewan Uji	Waktu Pengamatan		
		Ad Interim (6 bulan)	Utama (12 bulan)	Satelit (12 bulan + 28 hari)
Kontrol				
Kontrol jantan	20	10	10	
Kontrol betina	20	10	10	
Dosis rendah				
Dosis rendah jantan	20	10	10	
Dosis rendah betina	20	10	10	
Dosis tengah				
Dosis tengah jantan	20	10	10	
Dosis tengah betina	20	10	10	
Dosis tinggi				
Dosis tinggi jantan	20	10	10	
Dosis tinggi betina	20	10	10	
Satelit kontrol				
Satelit kontrol jantan	5			5
Satelit kontrol betina	5			5
Satelit dosis tinggi				
Satelit dosis tinggi jantan	5			5
Satelit dosis tinggi betina	5			5
Jumlah	180			

K. 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 µL. Selanjutnya darah diperiksa menggunakan alat Hematoanalyzer sesuai dengan kebutuhan data yang diperlukan.

L. 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. Bermacam 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.

M. 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 c*olorimetric 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 37^0 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:

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

N. 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 spektrofoto-meter 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 µL, 1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 10 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan albumin dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex, inkubasi pada suhu 37^0 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:

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

O. 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 µL, 100µL, 1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 10 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan nitrogen urea dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37^0 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:

$\Delta\ A\ sampel = (A2 - A1)$

$\Delta\ A\ blangko = (A2 - A1)$

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

P. 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 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan kreatinin dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37^0 C tepat setelah 60 detik pada panjang gelombang 492 nm (A1), diukur lagi absorbansi tepat setelah 120 detik (A2). Hal yang sama dilakukan terhadap blangko (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:

$\Delta\, A\, sampel = (A2 - A1)$

$\Delta\, A\, blangko = (A2 - A1)$

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

Q. Penetapan kadar bilirubin total

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar bilirubin total dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar bilirubin total dilakukan dengan metode c*olorimetric 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 µL,1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 25 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi A dalam tabung reaksi 5 mL, diinkubasi pada suhu 37^0 C selama 5 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm (A1), kemudian tambahkan pereaksi B sejumlah 250 µL 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:

$\Delta\ A\ sampel = (A2 - A1)$

$\Delta\ A\ blangko = (A2 - A1)$

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

R. Penetapan kadar glukosa

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar glukosa dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar glukosa dilakukan dengan metode e*nzymatic 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
- ≥ 15 KU/I glukosa oksidase
- ≥ 1 KU/I peroksidase

Standar glukosa 100 mg/dL

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 20 µL, 1000 µL

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 37^0 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:

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

S. Penetapan kadar kolesterol total

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar kolesterol total dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar kolesterol dilakukan dengan metode c*olorimetric 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 G*ood's buffer* (bufer fosfat) pH 6,7
- 5 mM fenol
- 0,3 mM 4-aminioantipirin
- ≥ 200 U/I kolesterol esterase
- ≥ 50 U/I kolesterol oksidase
- ≥ 3 KU/I peroksidase

Standar kolesterol 200 mg/dL

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

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

Prosedur

Sejumlah 10 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan kolesterol di dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex, diinkubasi pada suhu 37^0 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:

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

T. Penetapan kadar trigliserida

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar trigliserida dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar trigliserida dilakukan dengan metode c*olorimetric 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 G*ood's buffer* (bufer fosfat) pH 7,2
- 4 mmol/L 4-chlorophenol
- 2 mmol/L ATP
- 15 mmol/L Mg^{2+}
- $\geq$ 0,4 KU/I glycerokinase
- $\geq$ 2 KU/I peroxidase
- $\geq$ 2 KU/I lipoprotein lipase
- 0,5 mmol/L 4-aminoantipyrine

- ≥ 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 µL, 1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 10 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan trigliserida di dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex, diinkubasi pada suhu 37^0 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:

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

U. 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-glycyglycine* 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 µL, 1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 100 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan γ-GT di dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37^0 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:

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

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

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

V. 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 µL, 1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 20 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan fosfatase alkali dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37^0 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:

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

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

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

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

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar GOT dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar GOT dilakukan dengan metode o*ptimized 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 37^0 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
- $\geq$ 600 U/I MDH
- $\geq$ 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 µL,1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 100 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan GOT di dalam tabung reaksi 5 mL dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37^0C 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:

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

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

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

X. Penetapan kadar GPT (Glutamat Piruvat Transaminase)

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar GPT dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar GPT dilakukan dengan metode o*ptimized 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 37^0C 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 mM2-oksaloglutarat
- 0.18 mMNADH

Alat

Spektrofotometer

Penangas air

Vortex

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 100 µL,1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 100 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan GPT dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37^0 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:

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

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

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

Y. 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 37^0 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 µL, 1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 10 µL serum uji direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan LDH dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada suhu 37^0 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:

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

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

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

Z. 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 µL, 100µL,1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

- Presipitasi

  50 µL 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 µL 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:

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

AA. Penetapan kadar kalium

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar kalium dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar kalium dilakukan dengan n*ephelometric 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 µL, 100µL,1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

- Presipitasi

  100 µL 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 µL 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 (±30^0 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:

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

BB. Penetapan kadar asam empedu

Ruang lingkup

Cara ini digunakan untuk menetapkan kadar asam empedu dalam serum.

Prinsip

Penetapan kadar asam empedu dilakukan dengan metode c*olorimetric endpoint.* Pereaksi B (*3a 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 µM

Alat

Spektrofotometer

Vortex

Penangas air

Tabung reaksi ukuran 5 mL

Pipet Eppendorf 20 µL, 100 µL,1000 µL

Tip Eppendorf kuning dan biru

Prosedur

Sejumlah 80 µL serum uji direaksikan dengan 600 µL pereaksi A dalam tabung reaksi 5 mL dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37^0 C selama 4 menit, Absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm (A1), ditambahkan pereaksi B sejumlah 120 µL 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 absorbansis standar yang dikalikan dengan konsentrasi bilirubin standar. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

$$\Delta\, A\, sampel = (A2 - A1)$$

$$\Delta\, A\, blangko = (A2 - A1)$$

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

CC. 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 pada kelompok yang diamati dengan menggunakan referensi atau literatur yang shahih dalam penentuan skor.

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 ferosianida; larutan natrium bisulfat 3%; larutan Nuclear Fast Red; larutan Sudan III, larutan Eukit, etanol absolut, aquades, kertas tissue.

Alat

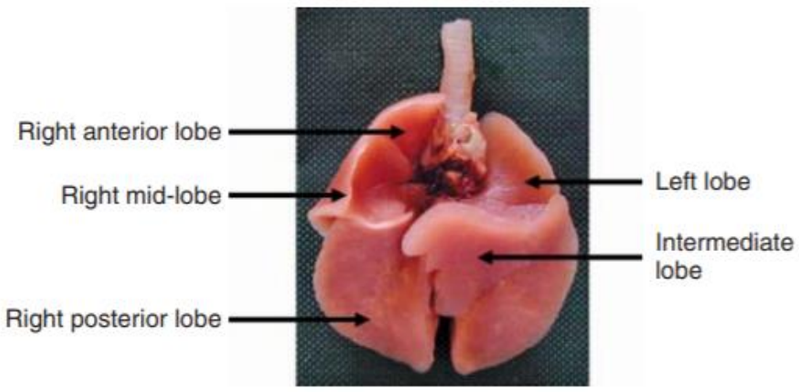
Pisau, kantong kasa, kain kasa, botol fiksasi, botol dehidrasi, alat dehidrasi otomatis, blok kayu, alat potong beku, mikrotom, kaca obyek, lemari pemanas, alat pewarna jaringan, mikroskop binokuler, obyek glas, cover glas.

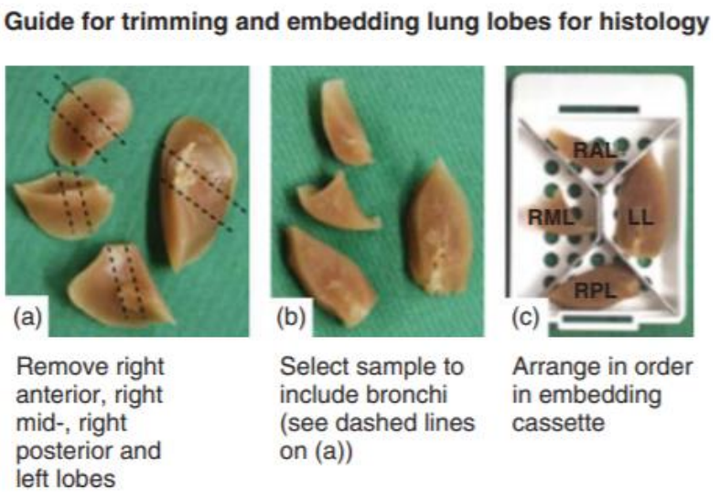
Prosedur

a. Pengambilan sampel

Sampel yang diambil sesegera mungkin setelah hewan dimatikan (dieuthanasia). Organ yang diperlukan diambil dan dipotong dengan ukuran 1 cm^3. 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.





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 (25^0 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

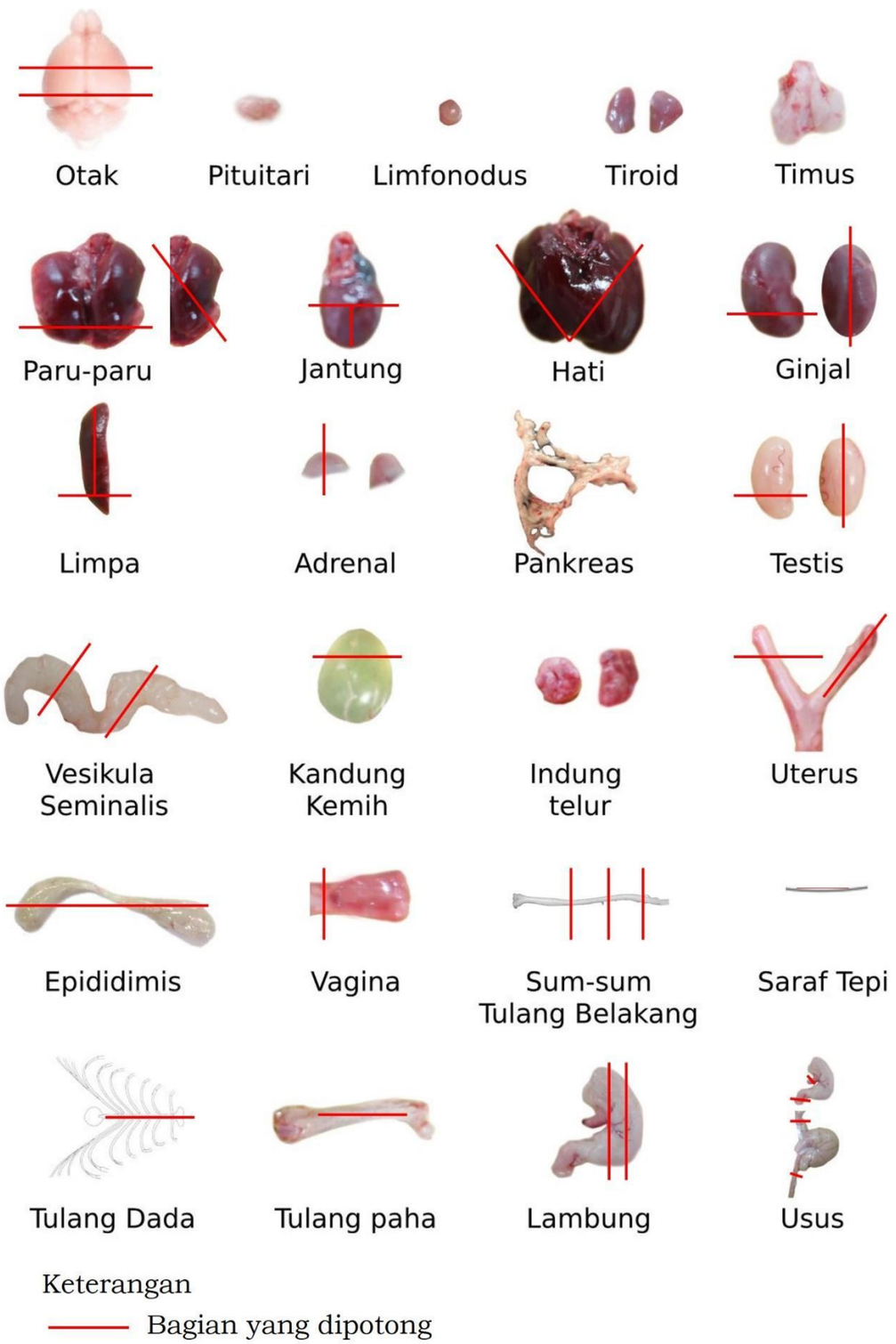
sudah lunak, maka proses dekalsifikasi dihentikan kemudian tulang dicuci dengan air mengalir selama 6 jam. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi.

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 15. Kemudian potongan organ dari setiap hewan dimasukan ke dalam satu kaset, tulang dimasukan 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 15. 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 pembeningan 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 (ditunjukan 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^{0}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 – 58^0 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 (± 30^0 C) atau disimpan dalam incubator (± 37 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 μm 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 30^0 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 – 60^0C 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.)

DD. 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

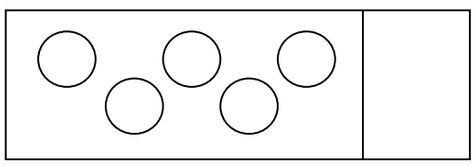
Penyiapan sediaan

Larutan natrium klorida 0,9 %

Sejumlah 0,9 g natrium klorida dilarutkan dalam air hingga 100 mL

Prosedur

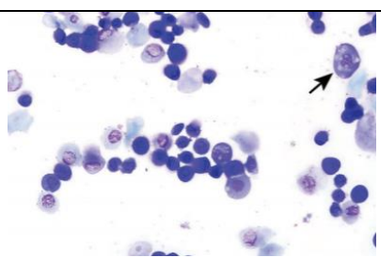
Tikus betina dari masing-masing kandang secara berurutan diambil, kemudian ke dalam lubang vaginanya dimasukan ujung pipet yang telah berisi larutan natrium klorida 0,9 % secukupnya. Dengan perlahan-lahan dan hati-hati larutan tersebut disemprotkan dan disedot dengan pipet beberapa kali di dalam vagina, kemudian cairan vagina diambil sedikit dengan pipet dan diteteskan 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 16.

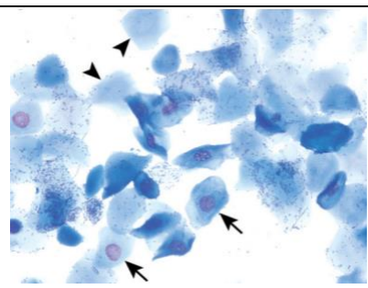
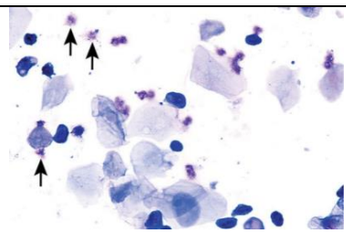


Gambar 16. Posisi penempatan cairan vagina pada kaca objek

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

EE. 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 dimasukan 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.

FF. 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 kebuntingan 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 kebuntingan, 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-l 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 kebuntingan). 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 pengelompokkan sebelumnya dengan tetap mempertimbangkan bobot tubuh rata-rata tiap kelompok dosis dari data alokasi sebelumnya. Hasil alokasi dicatat pada label ditiap kandang hewan dan kertas dokumentasi.

GG. 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 tissu

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

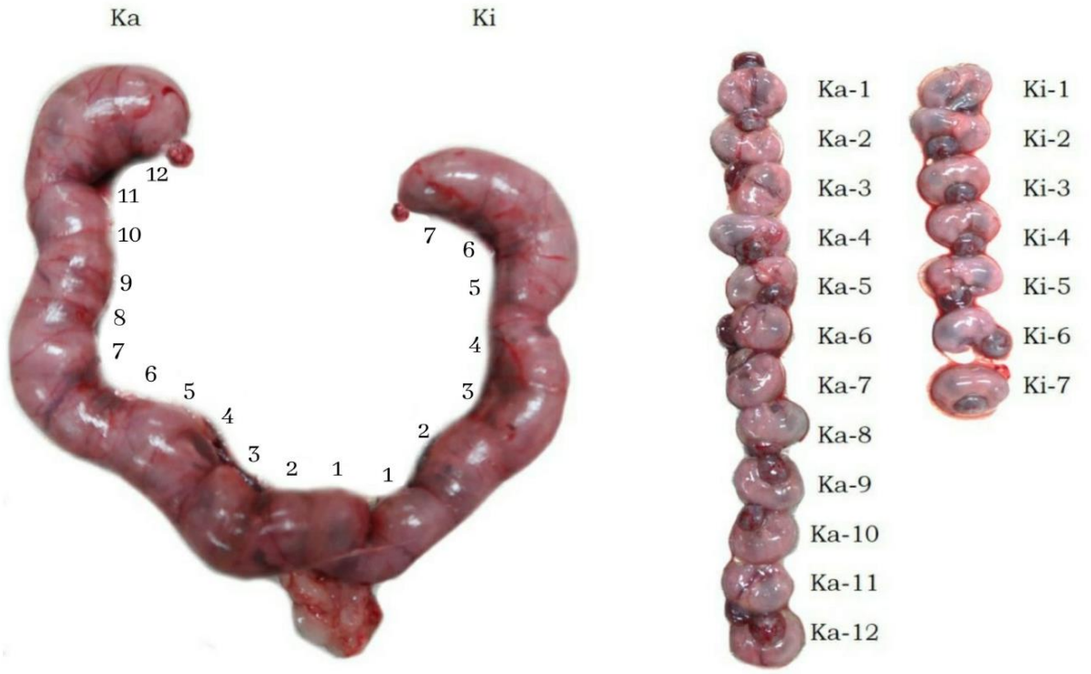
1. Pembedahan

Tikus yang akan dibedah ditimbang bobot tubuh dan konsumsi pakannya. Sebelum dibedah tikus dikorbankan 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 dibeberkan. 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:

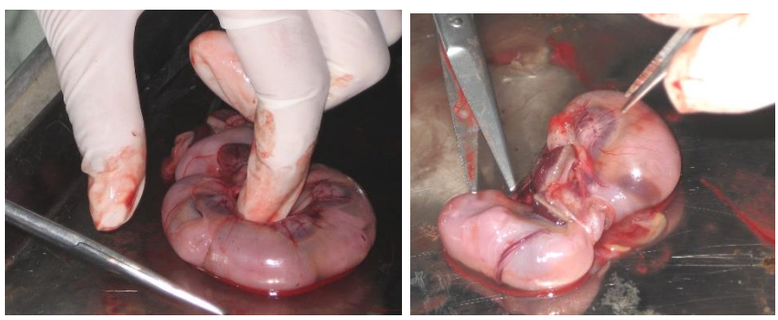
a. Hidup
b. Kematian fetus (foetal death/FD), fetus baru saja mati, bentuknya lengkap, tapi warnanya lebih pucat dari normal
c. Kematian lambat (*late death*, LD), organogenesis telah terjadi sehingga embrio sudah tampak tetapi perkembangannya tidak sampai ke tingkat fetus.
d. Kematian awal (*early death*, 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 17).



Gambar 17. 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. *Implan*t 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 18).



(a) (b)

Gambar 18. 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

19).



(a) (b)

Gambar 19. 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 dimasukan 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 dimasukan ke dalam botol yang berisi larutan Bouin

HH. 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 aqudest 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 20).



(a) (b)



(c)

Gambar 20. 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

II. 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 %

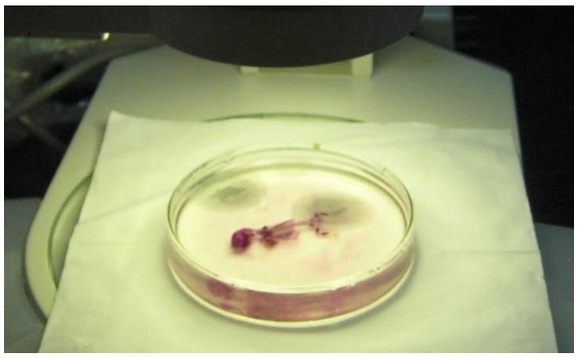
Alat

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 kedalam 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 21). Semua hasil pemeriksaan berupa struktur, morfologi, jumlah, ukuran, posisi tulang dan derajat pewarnaan dicatat pada kertas dokumentasi. Kerangka yang telah dinilai dikembalikan kedalam kotak preparat kerangka.



Gambar 21. Kerangka fetus untuk pengamatan mikroskopik

JJ. 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

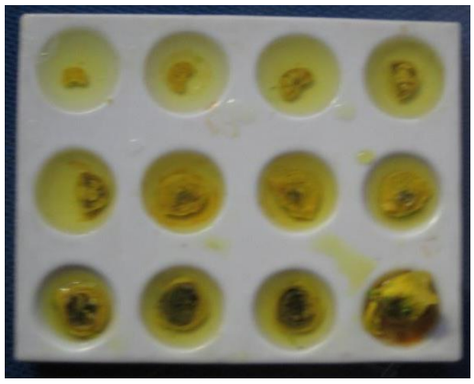
Rangkaian fetus dari satu induk dipindahkan ke dalam gelas piala dan dialiri air perlahan-lahan sampai bau formalin hilang/berkurang, diambil satu fetus, dikeringkan dengan kertas tisu, kepala bagian atas diantara kedua rahang dan disebelah bawah telinga dipotong menggunakan pisau mikrotom, permukaan 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 22).



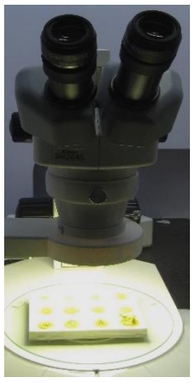
(a)



(b)



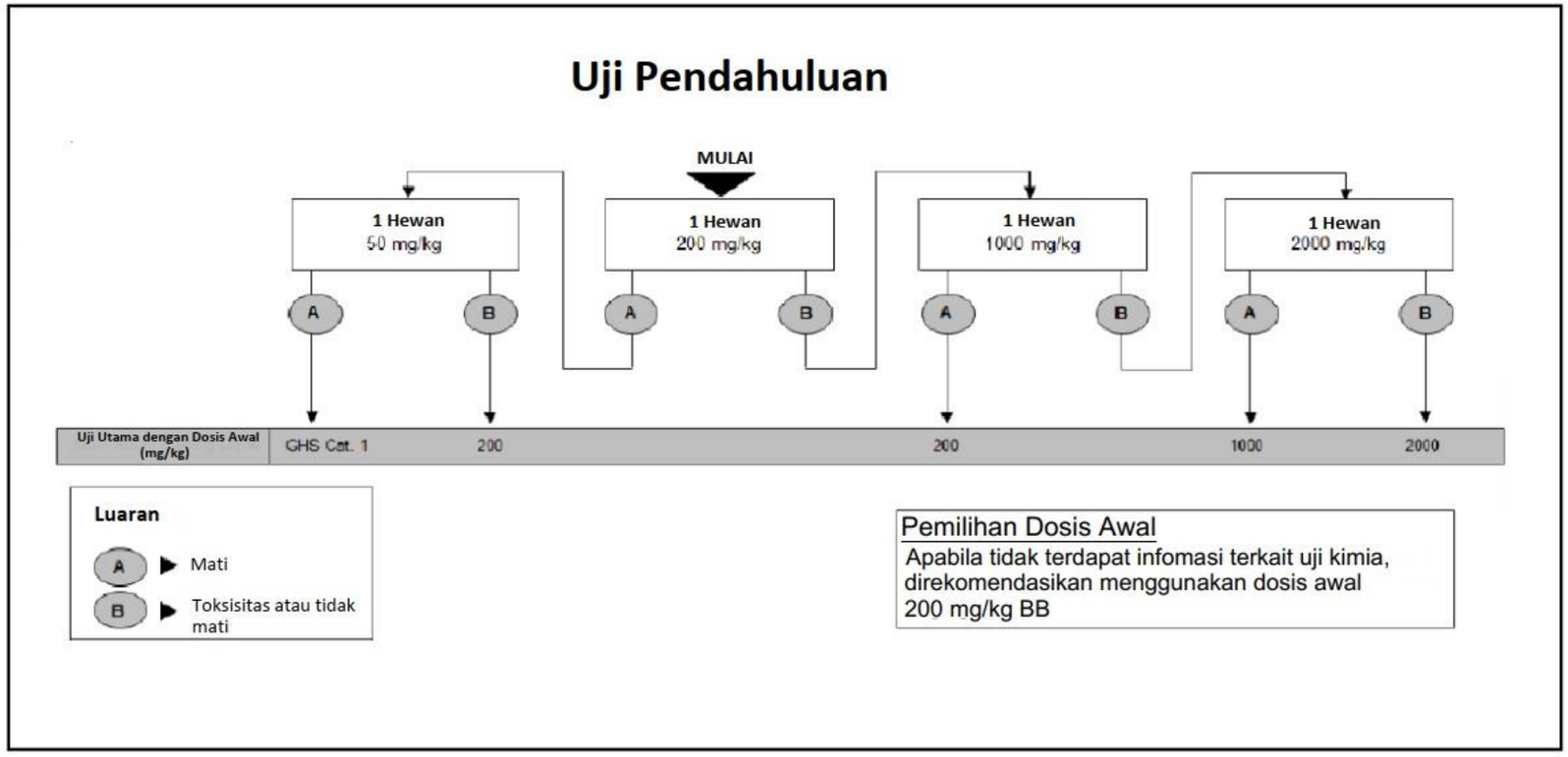
(c)



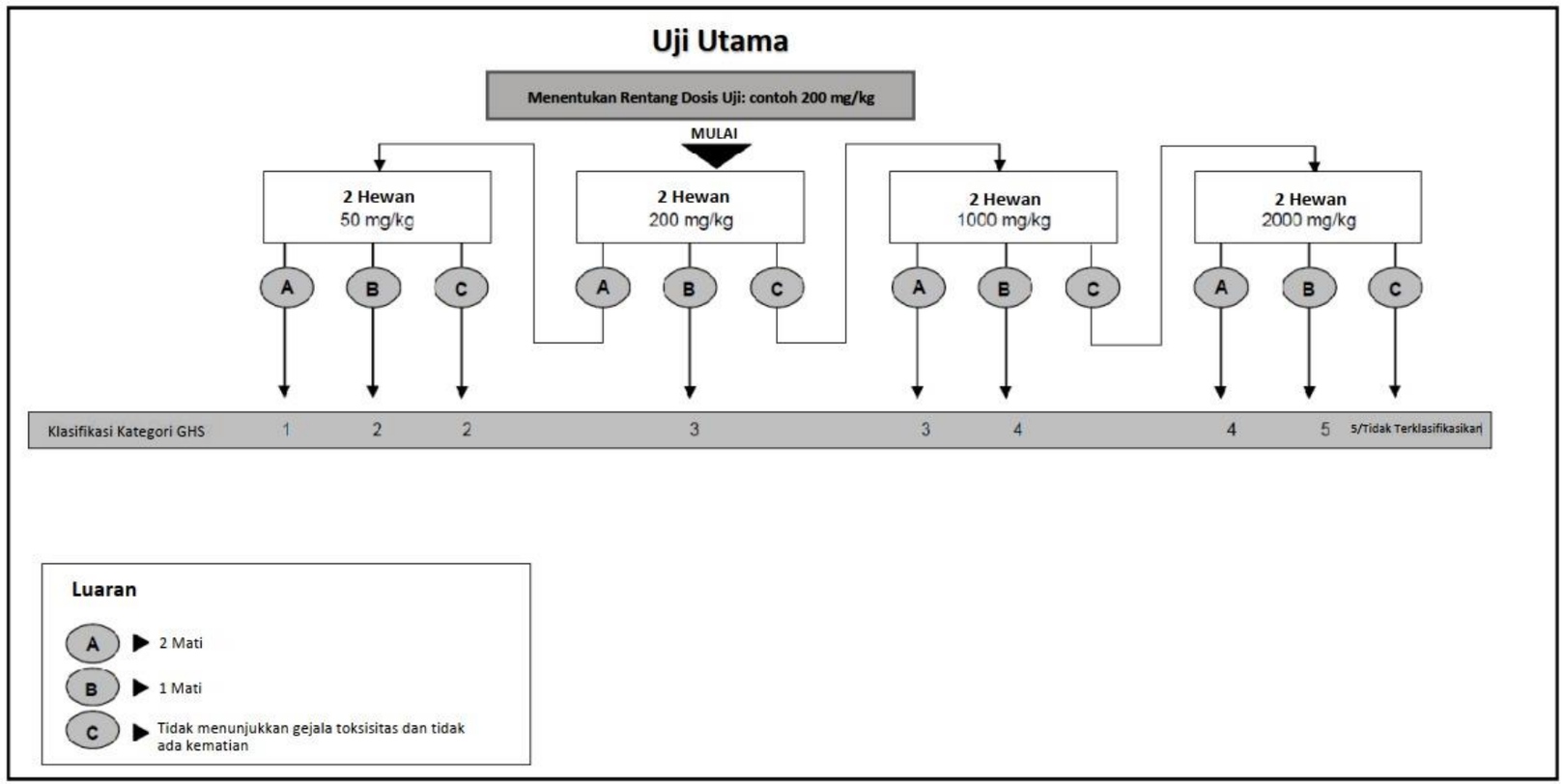
(d)

Gambar 22. 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

KK. Bagan uji pendahuluan (*Range-Finding Study*) pada Uji Toksisitas Akut Dermal.



LL. Bagan uji utama (*Main Study*) pada Uji Toksisitas Akut Dermal.



MM. 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.

LD_{50} (*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. LD_{50} dinyatakan sebagai berat sediaan uji per berat badan hewan uji (mg/kg).

Iritasi kulit

Cedera kulit *reversible* akibat pajanan bahan uji secara dermal.

Korosi kulit

Kerusakan kulit yang bersifat ireversibel (nekrosis) dari epidermis sampai dermis akibat pajanan sediaan uji, dapat berupa ulkus, perdarahan, hilangnya warna kulit, alopesia 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 dikorbankan 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.

NN. Perhitungan Matematis untuk Hasil Pengujian dengan Protokol Cxt

Prosedur C x t dengan 4 atau 5 konsentrasi pajanan, serta 5 durasi akan menghasilkan masing-masing 20 atau 25 titik data. Dengan titik data ini, hubungan C x t dapat dihitung menggunakan analisis statistik:

$Probit\ (P) = b_0 + b_1\ ln\ C + b_2\ ln\ t$ Persamaan 1

dimana C = konsentrasi ; t = durasi pajanan, atau

$Response = f(C^n t)$ Persamaan 2

dimana $n = b_1/b_2$

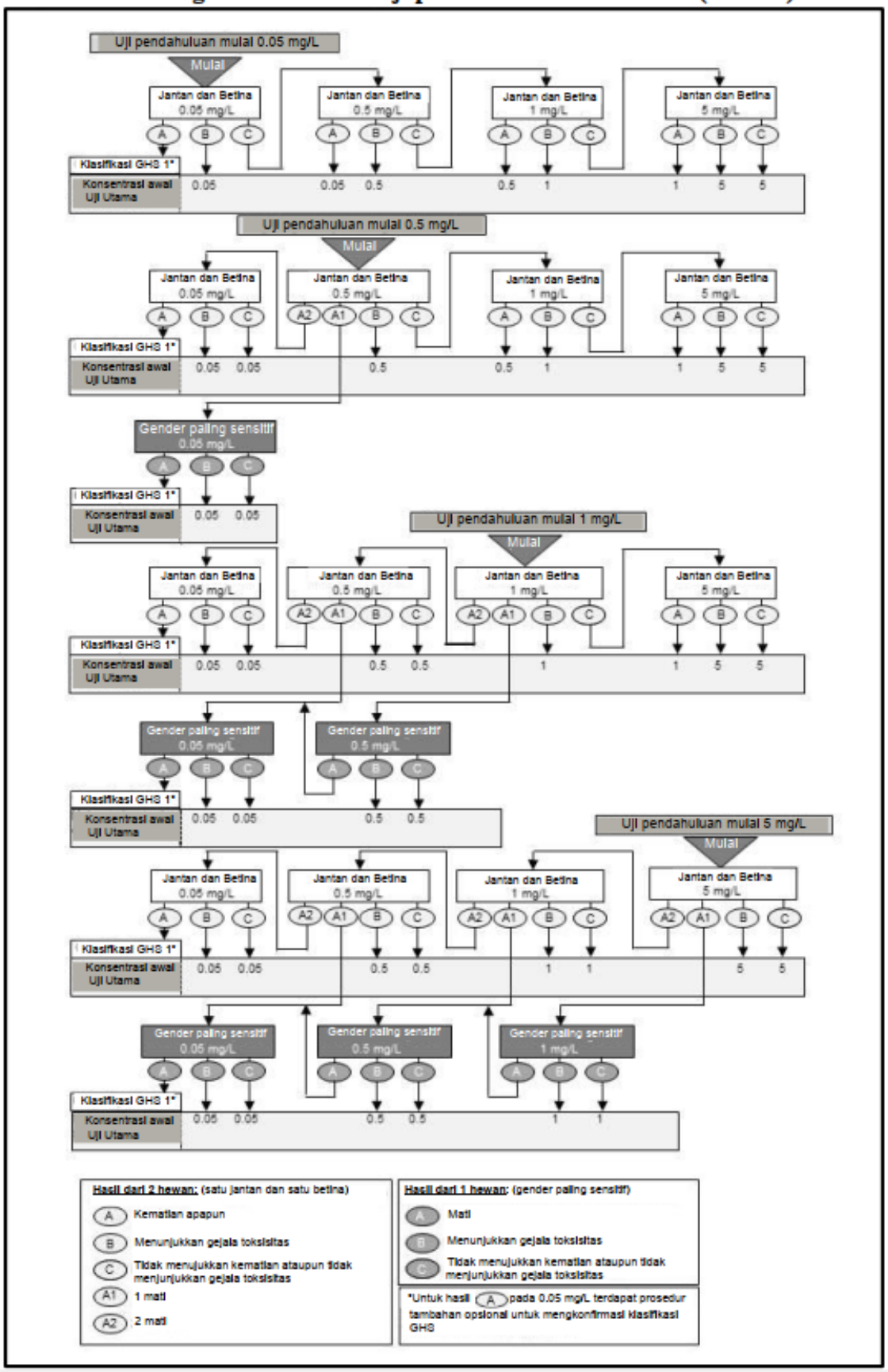
Menggunakan persamaan 1, nilai LC_{50} dapat dihitung untuk periode waktu tertentu (misalnya 4 jam, 1 jam, 30 menit, atau periode waktu berapapun dalam rentang periode waktu uji) menggunakan P = 5 (respons 50%). Perhatikan bahwa aturan Haber hanya berlaku jika n = 1. LC_{01} dapat dihitung menggunakan P = 2.67

Keterangan:

b= *slope* atau kemiringan

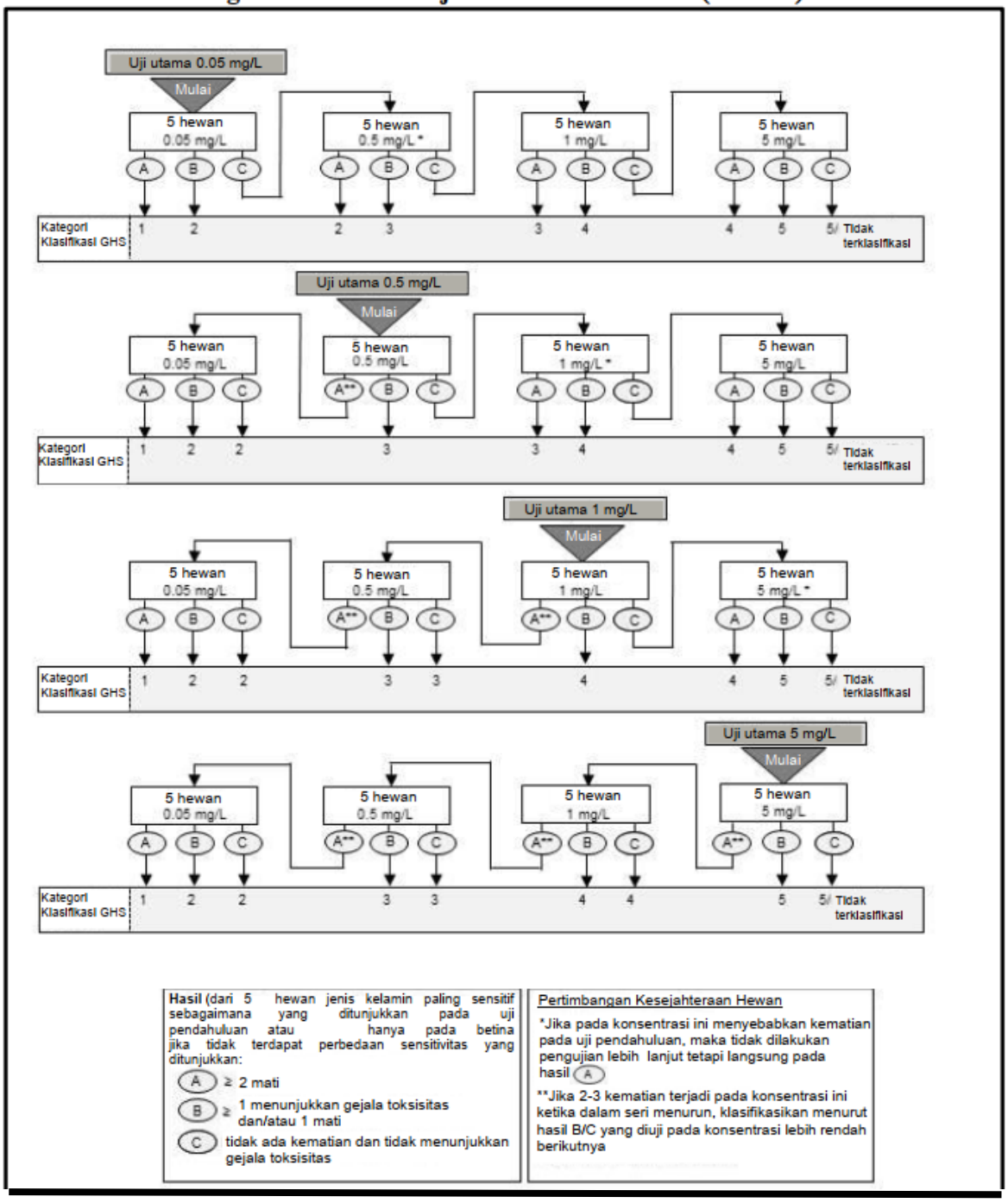
OO. Bagan uji pendahuluan pada Uji Toksisitas Akut Inhalasi untuk aerosol *(Fixed Dose Method)*

Diagram alir untuk uji pendahuluan - debu/*mist* (aerosol)



PP. Bagan uji utama (*Main Study*) pada Uji Toksisitas Akut Inhalasi untuk aerosol (*Fixed Dose Method*)

Diagram alir untuk uji utama - debu/mists (aerosol)



Hasil (dari 5 hewan jenis kelamin paling sensitif sebagaimana yang ditunjukkan pada uji pendahuluan atau hanya pada betina jika tidak terdapat perbedaan sensitivitas yang ditunjukkan:

- (A) ≥ 2 mati
- (B) ≥ 1 menunjukkan gejala toksisitas dan/atau 1 mati
- (C) tidak ada kematian dan tidak menunjukkan gejala toksisitas

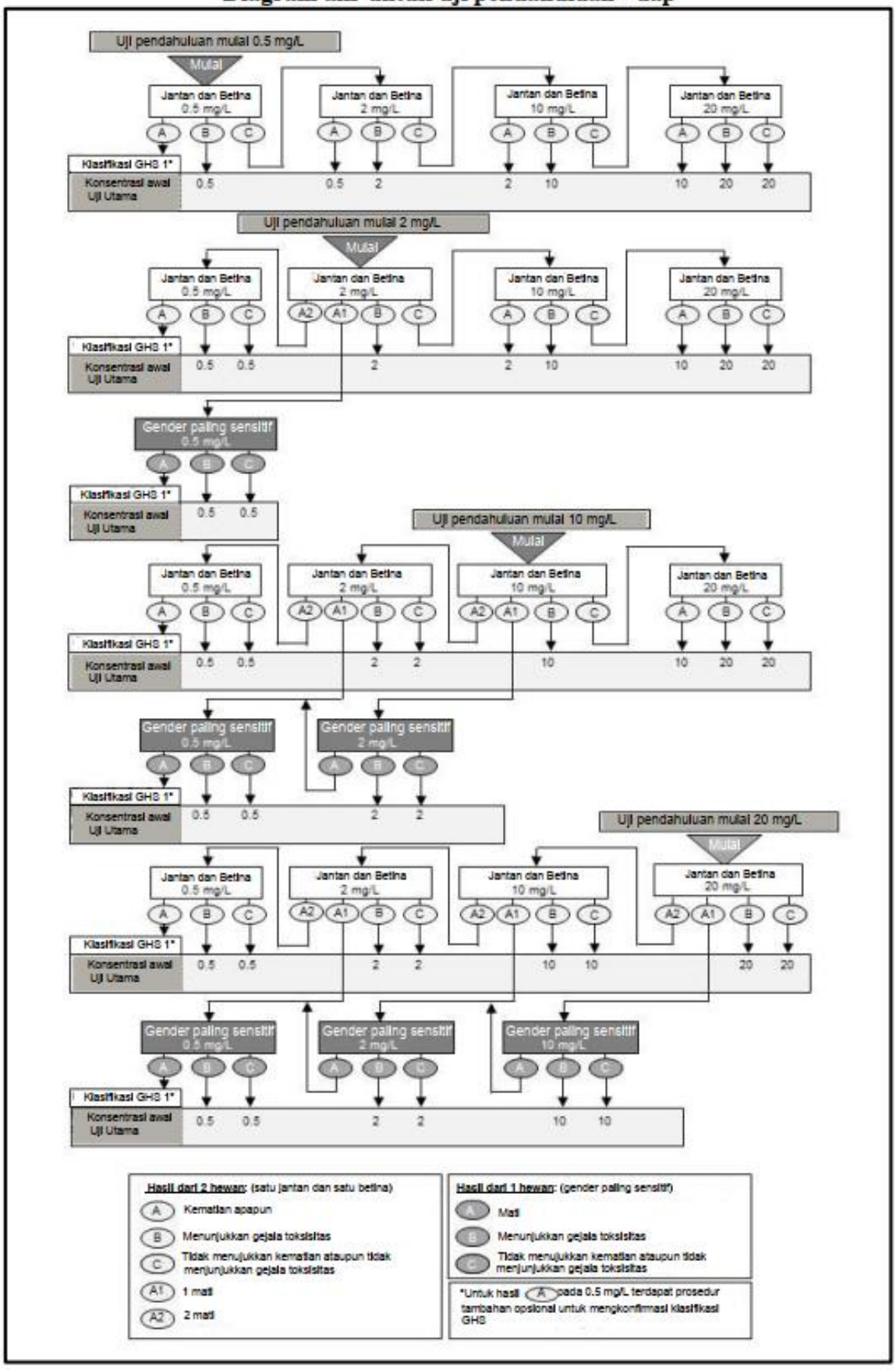
Pertimbangan Kesejahteraan Hewan

*Jika pada konsentrasi ini menyebabkan kematian pada uji pendahuluan, maka tidak dilakukan pengujian lebih lanjut tetapi langsung pada hasil (A)

**Jika 2-3 kematian terjadi pada konsentrasi ini ketika dalam seri menurun, klasifikasikan menurut hasil B/C yang diuji pada konsentrasi lebih rendah berikutnya

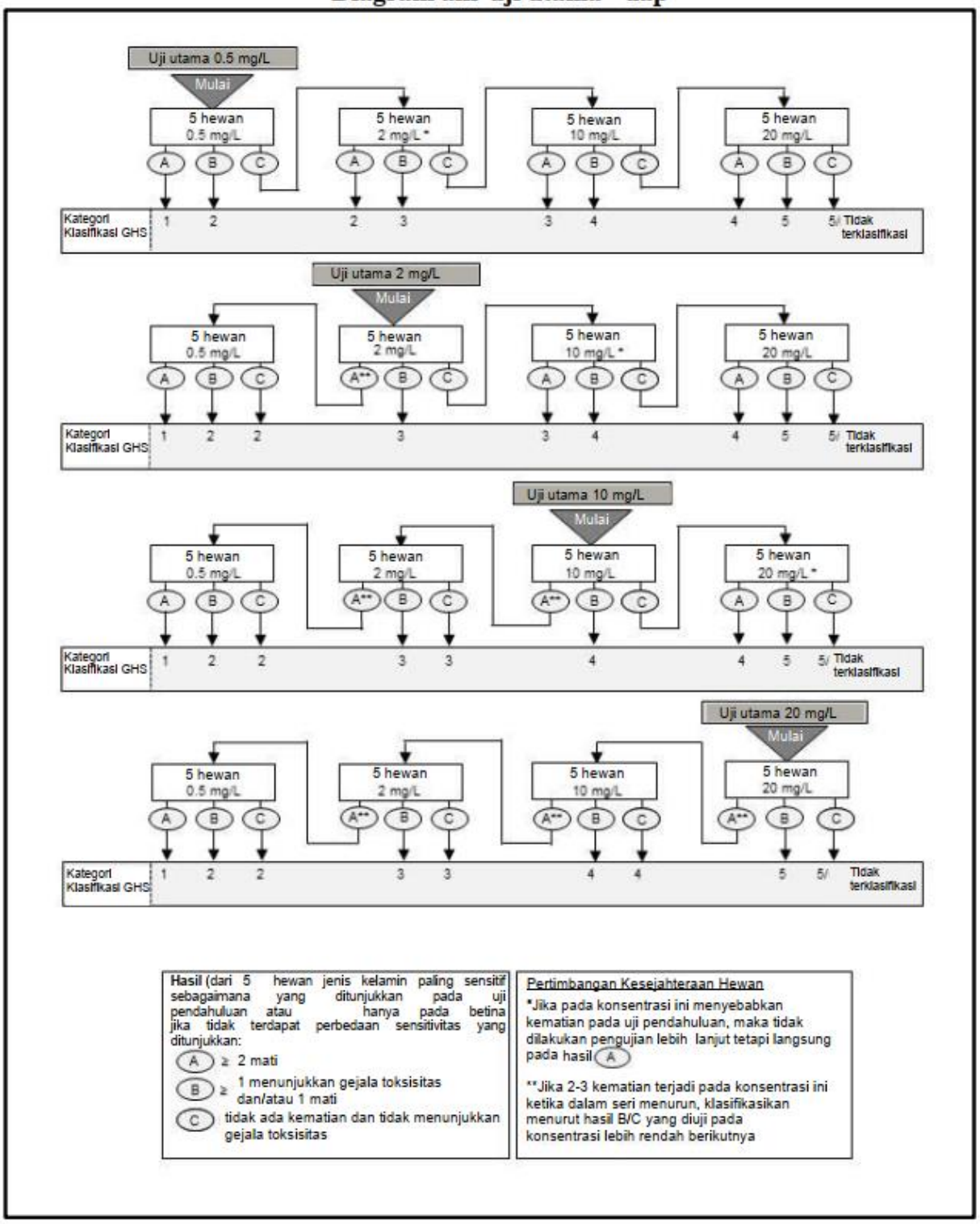
QQ. Bagan uji pendahuluan pada Uji Toksisitas Akut Inhalasi untuk uap (*Fixed Dose Method*)

Diagram alir untuk uji pendahuluan - uap



RR. Bagan uji utama (*Main Study*) pada Uji Toksisitas Akut Inhalasi untuk uap (*Fixed Dose Method*)

Diagram alir uji utama - uap



Hasil (dari 5 hewan jenis kelamin paling sensitif sebagaimana yang ditunjukkan pada uji pendahuluan atau hanya pada betina jika tidak terdapat perbedaan sensitivitas yang ditunjukkan:

- (A) ≥ 2 mati
- (B) ≥ 1 menunjukkan gejala toksisitas dan/atau 1 mati
- (C) tidak ada kematian dan tidak menunjukkan gejala toksisitas

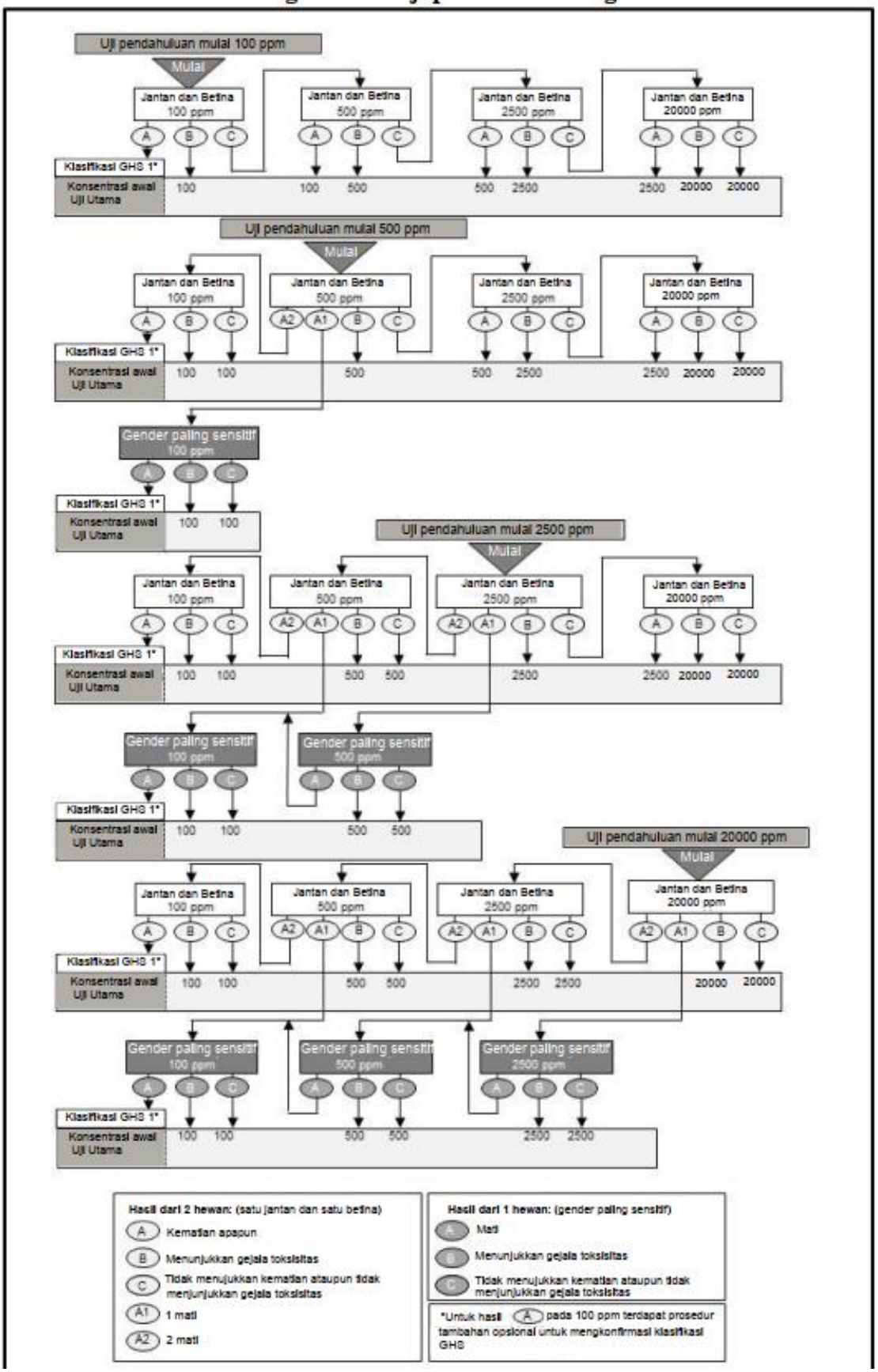
Pertimbangan Kesejahteraan Hewan

*Jika pada konsentrasi ini menyebabkan kematian pada uji pendahuluan, maka tidak dilakukan pengujian lebih lanjut tetapi langsung pada hasil (A)

**Jika 2-3 kematian terjadi pada konsentrasi ini ketika dalam seri menurun, klasifikasikan menurut hasil B/C yang diuji pada konsentrasi lebih rendah berikutnya

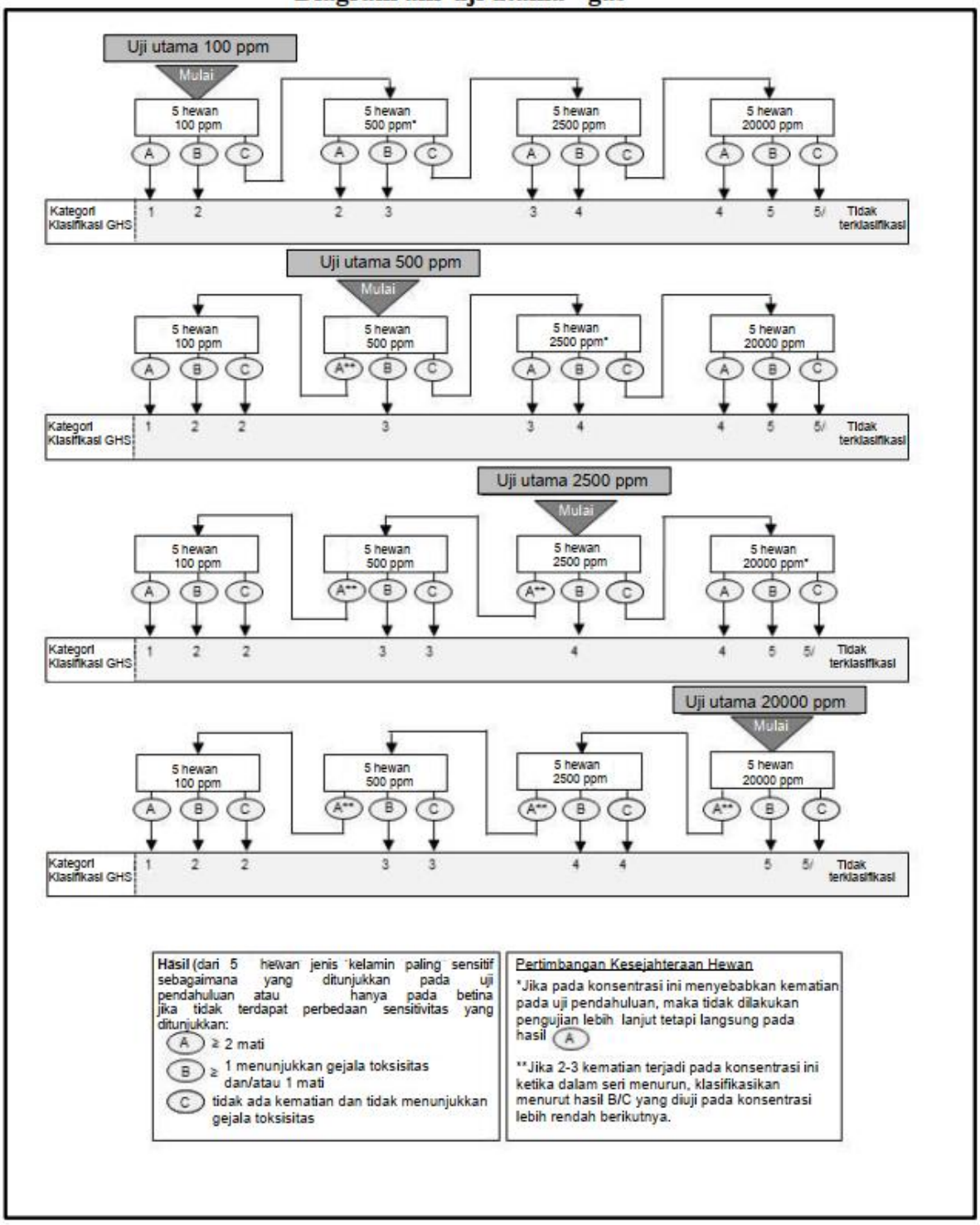
SS. Bagan uji pendahuluan pada Uji Toksisitas Akut Inhalasi untuk gas (*Fixed Dose Method*)

Diagram alir uji pendahuluan – gas



TT. Bagan uji utama (*Main Study*) pada Uji Toksisitas Akut Inhalasi untuk gas (*Fixed Dose Method*)

Diagram alir uji utama - gas



Hasil (dari 5 hewan jenis kelamin paling sensitif sebagaimana yang ditunjukkan pada uji pendahuluan atau hanya pada betina jika tidak terdapat perbedaan sensitivitas yang ditunjukkan:

- (A) ≥ 2 mati
- (B) ≥ 1 menunjukkan gejala toksisitas dan/atau 1 mati
- (C) tidak ada kematian dan tidak menunjukkan gejala toksisitas

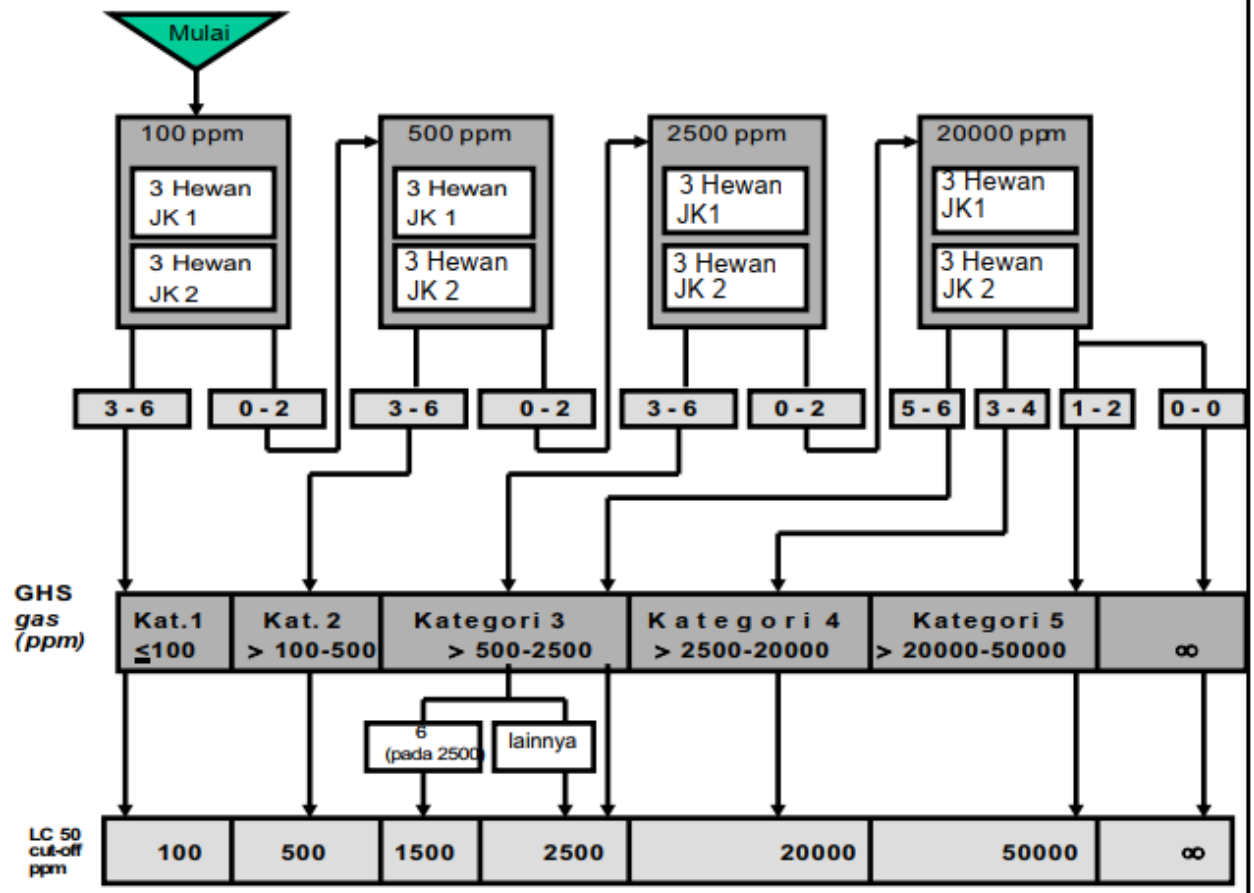
Pertimbangan Kesejahteraan Hewan

*Jika pada konsentrasi ini menyebabkan kematian pada uji pendahuluan, maka tidak dilakukan pengujian lebih lanjut tetapi langsung pada hasil (A)

**Jika 2-3 kematian terjadi pada konsentrasi ini ketika dalam seri menurun, klasifikasikan menurut hasil B/C yang diuji pada konsentrasi lebih rendah berikutnya.

UU. Bagan uji utama (*Main Study)* pada Uji Toksisitas Akut Inhalasi untuk gas *(Acute Toxic Class)*

Lampiran
Toksisitas Akut Inhalasi
Prosedur uji dengan konsetrasi awal 100 ppm/4jam untuk gas



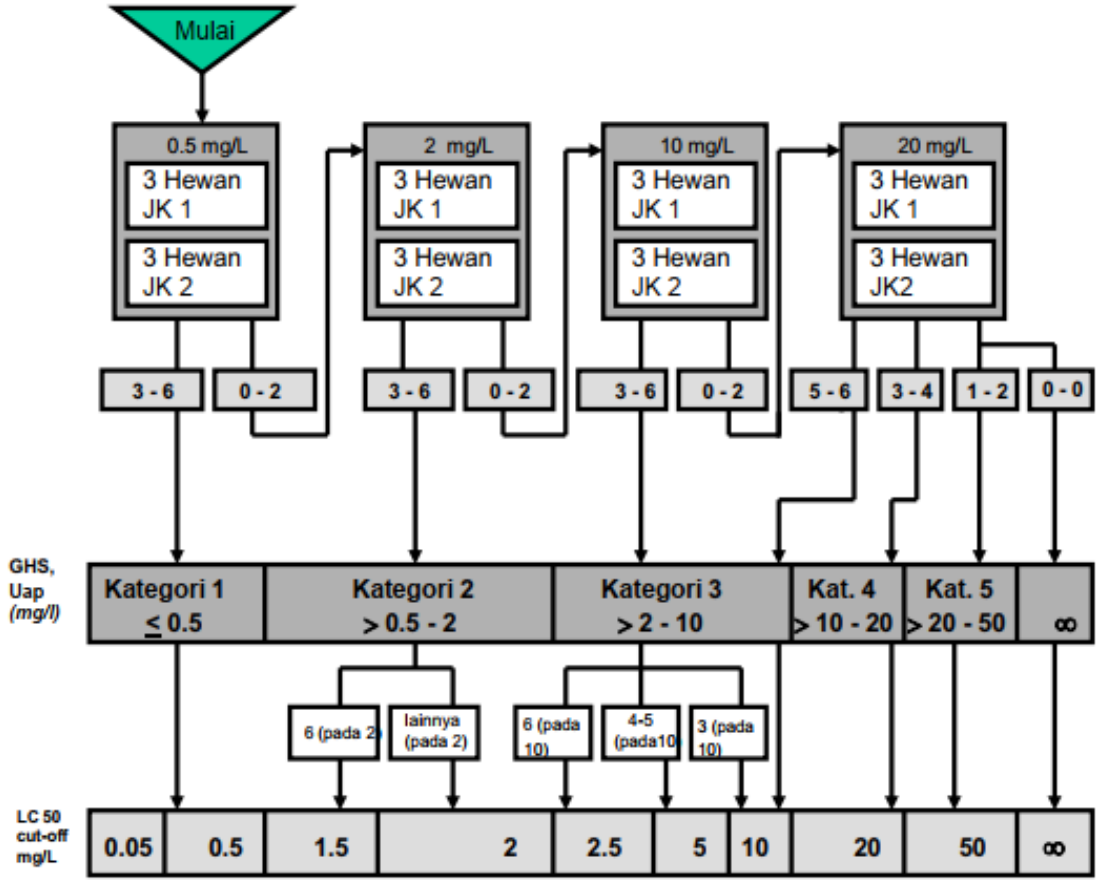
- 3 ♂+ 3 ♀, atau 6 hewan yang lebih rentan digunakan pada setiap tahapnya.
- 0-6: Jumlah hewan *moribund* atau hewan mati setiap konsetrasi pengujian
- GHS: *Globally Harmonized Classification System*
- ∞:tidak terklasifikasi
- Pengujian ≥ 20000 ppm/4jam: dapat dilihat pada *OECD Guidance Document 39*
- JK: Jenis Kelamin

VV. Bagan uji utama (*Main Study)* pada Uji Toksisitas Akut Inhalasi untuk uap *(Acute Toxic Class)*

Lampiran

Toksisitas Akut Inhalasi:

Prosedur uji dengan konsetrasi awal 0.5 mg/L/4jam untuk uap



-3 ♂ + 3 ♀, atau 6 hewan yang lebih rentan digunakan pada setiap tahapnya.

-0-6:Jumlah hewan moribund atau hewan mati setiap konsetrasi pengujian

-GHS:*Globally Harmonized Classification System*

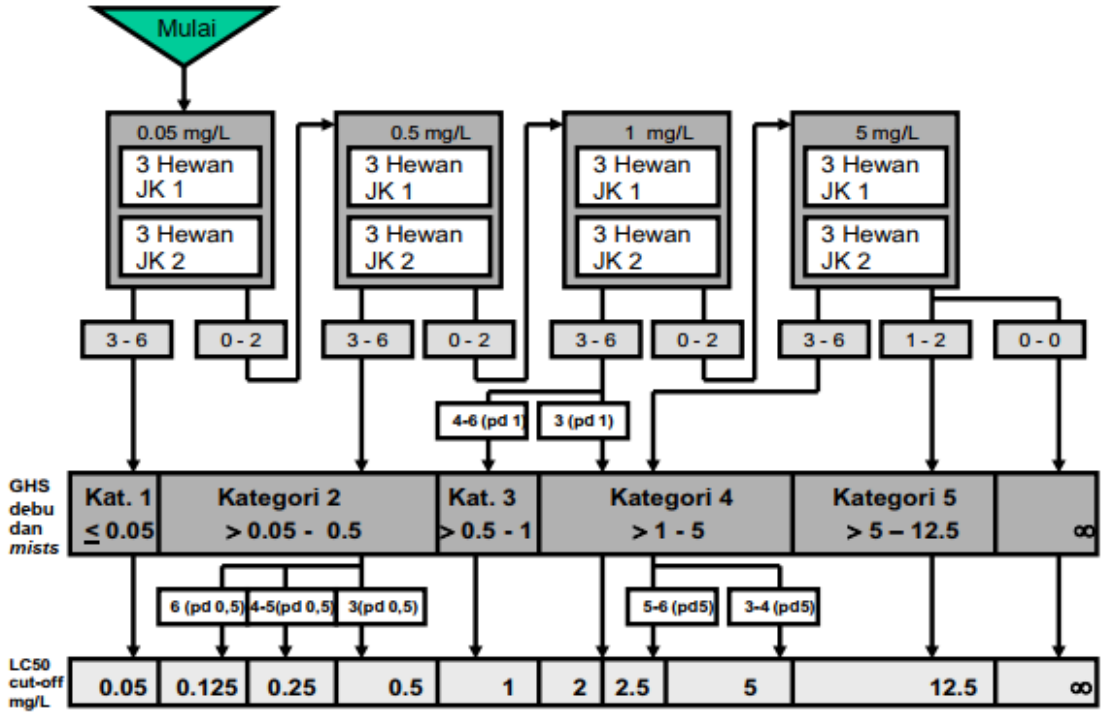
-∞:tidak terklasifikasi

-Pengujian pada 50 mg/L/4jam:dapat dilihat pada *OECD Guidance Document 39*

-JK: Jenis Kelamin

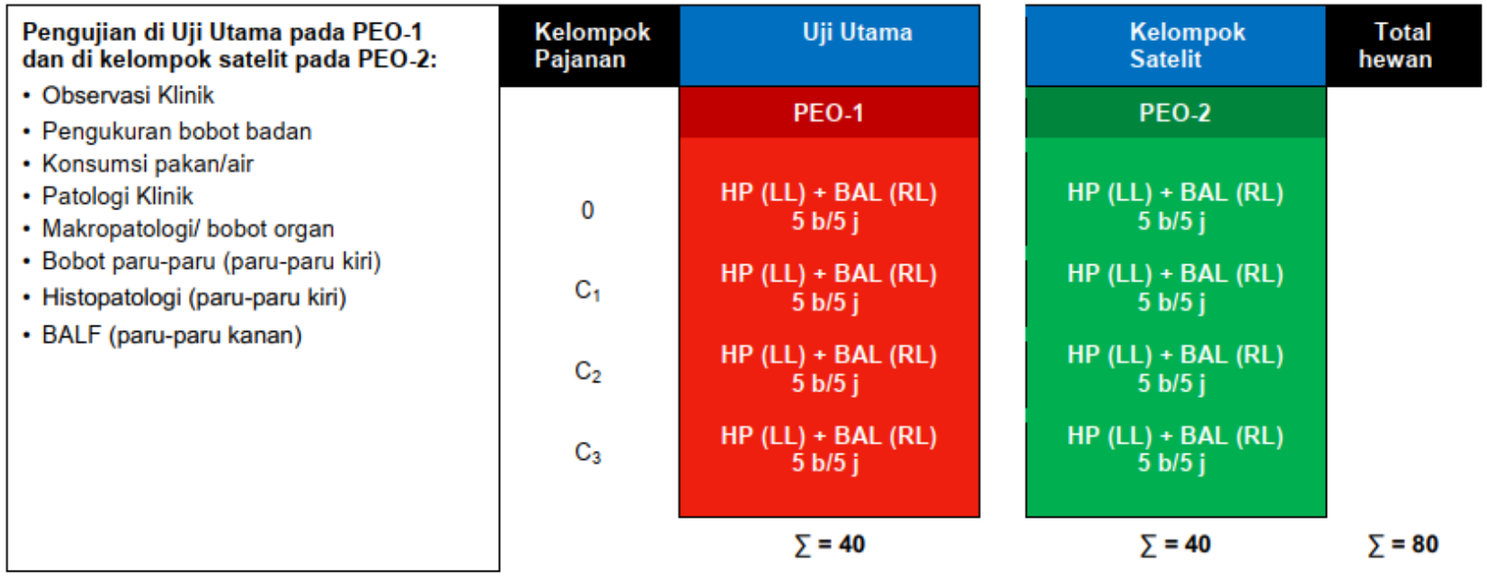
WW. Bagan uji utama (*Main Study)* pada Uji Toksisitas Akut Inhalasi untuk aerosol *(Acute Toxic Class)*

Lampiran
Toksisitas Akut Inhalasi:
Prosedur uji dengan konsetrasi awal 0.05 mg/L/4jam untuk aerosol



-3 ● + 3 ☺, atau 6 hewan yang lebih rentan digunakan pada setiap tahapnya.
-0-6:Jumlah hewan moribund atau hewan mati setiap konsetrasi pengujian
-GHS:Globally Harmonized Classification System
-∞:tidak terklasifikasi
-Pengujian pada 12.5 mg/L/4jam:dapat dilihat pada OECD Guidance Document 39
-JK: Jenis Kelamin

XX. Skema Pengujian untuk Toksisitas Subkronis Singkat 28 Hari (gas, uap, aerosol cair dan aerosol padat mudah larut)



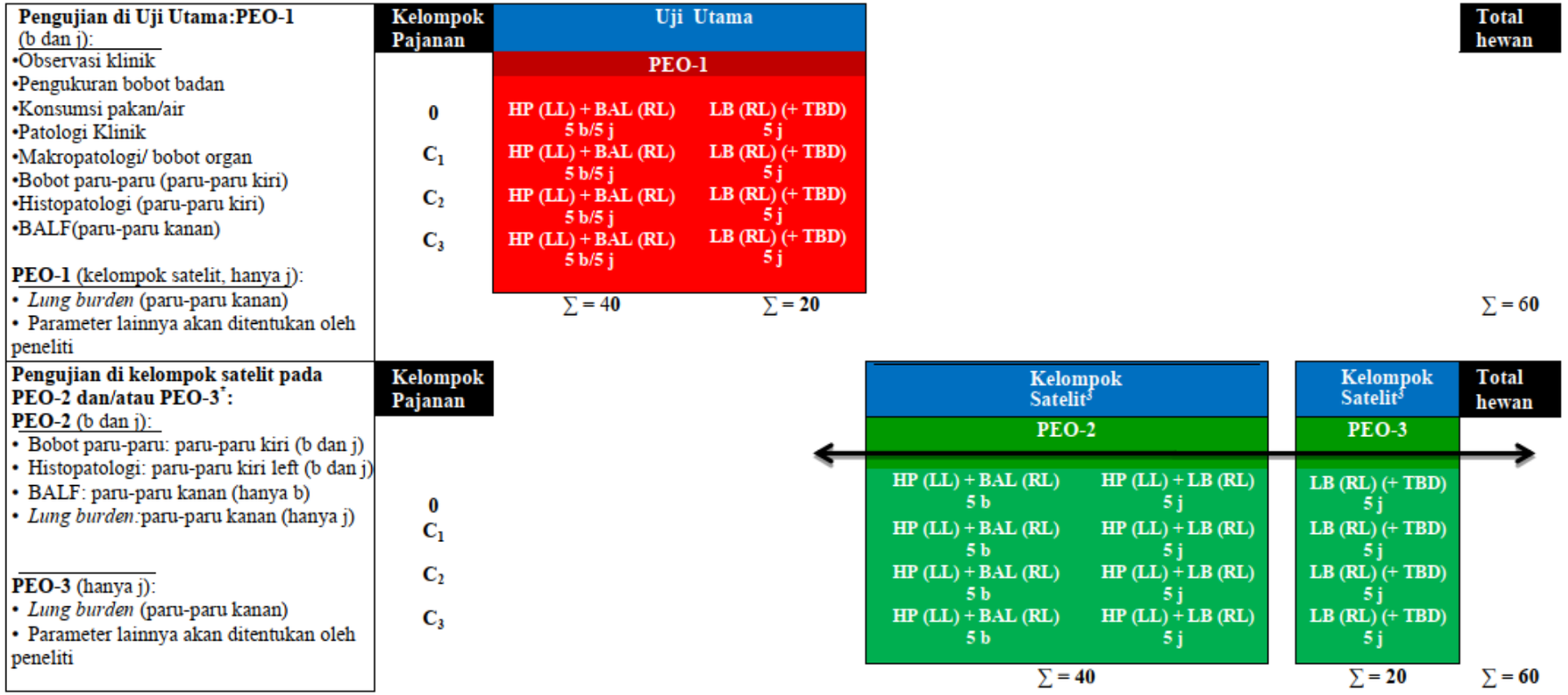
Abbreviations:

0	= kelompok kontrol	b	= betina
C_x	= konsentrasi pajanan	j	= jantan
BAL	= *bronchoalveolar lavage*	PEO	= *post-exposure observations*
HP	= histopatologi	PEO-1	= dalam satu hari setelah hari pajanan terakhir
LB	= lung burden	PEO-2	= dalam x minggu setelah hari pajanan terakhir
LL	= paru - paru kiri (*left lung*)	PEO-3	= dalam y minggu setelah hari pajanan terakhir (PEO-3 dapat sebelum atau setelah PEO-2)
RL	= paru - paru kanan (*right lung*)	TBD	= *to be determined*

Merah = Harus dilakukan
Hijau= Opsional

Catatan: Keberhasilan uji utama tergantung informasi yang diperoleh dari uji pendahuluan atau hasil uji sebelumnya. Semua uji kimia menggunakan Opsi A kecuali untuk aerosol padat sulit larut yang menggunakan Opsi B. GD 39 menjelaskan bagaimana peneliti dapat menyesuaikan kedua opsi tersebut untuk mengoptimasi penilaian bahaya dari uji kimia.

YY. Skema Pengujian untuk Toksisitas Subkronis Singkat 28 Hari (aerosol padat sulit larut)



Catatan: * Kebutuhan untuk penambhaan kelompik satelit pada PEO-2 dan/atau PEO-3, durasi dari interval pasca dan waktu PEO ditentukan oleh peneliti berdasarkan tujuan penelitian dan hasil uji pendahuluan dan/atau informasi relevan lainnya. Sebagai contoh, PEO-1, PEO-2 dan/atau PEO-3 digunakan ketika dibutuhkan beberapa pengukuran *lung burden* yang digunakan sebagai evaluasi *clearance kinetics* (lihat GD 39).

Merah = Harus dilakukan
Hijau = Opsional

ZZ. Skema Pengujian untuk Toksisitas Subkronis 90 Hari (gas, uap, aerosol cair dan aerosol padat mudah larut)

Pengujian di Uji Utama pada PEO-1 dan di kelompok satelit pada PEO-2:	Kelompok Pajanan	Uji Utama	Kelopok Satelit	Total Hewan
		PEO-1	PEO-2	
•Observasi klinik •Pengukuran bobot badan •Konsumsi pakan/air •Patologi Klinik •Makropatologi/ bobot organ •Bobot paru-paru (paru-paru kiri) •Histopatologi (paru-paru kiri) •BALF(paru-paru kanan)	0	HP (LL) + BAL (RL) 10 b/10 j	HP (LL) + BAL (RL) 5 b/5 j	
	C_1	HP (LL) + BAL (RL) 10 b/10 j	HP (LL) + BAL (RL) 5 b/5 j	
	C_2	HP (LL) + BAL (RL) 10 b/10 j	HP (LL) + BAL (RL) 5 b/5 j	
	C_3	HP (LL) + BAL (RL) 10 b/10 j	HP (LL) + BAL (RL) 5 b/5 j	
		∑ = 80	∑ = 40	∑ = 120

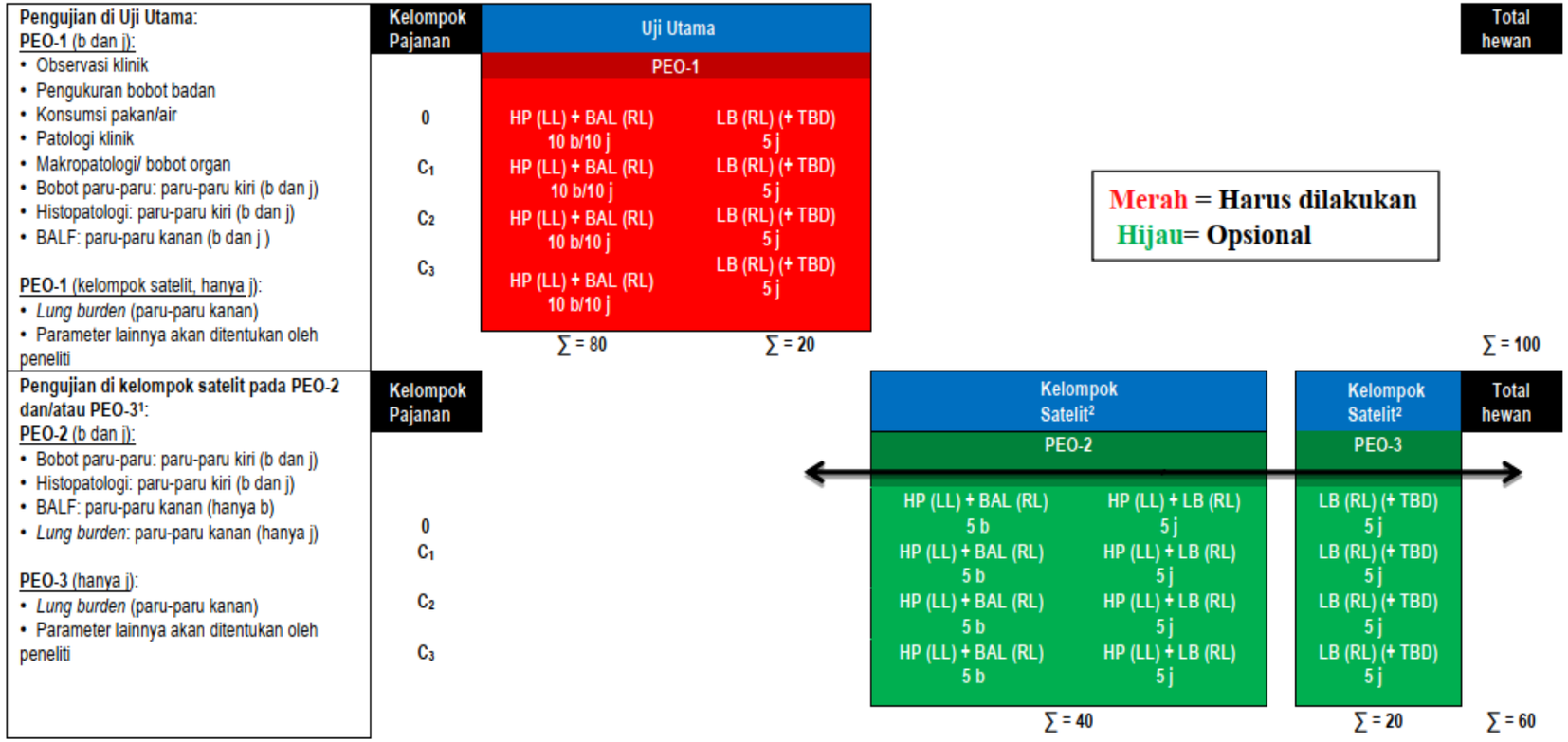
Abbreviations:

0	= kelompok kontrol	f	= betina
C_x	= konsentrasi pajanan	m	= jantan
BAL	= *bronchoalveolar lavage*	PEO	= *post-exposure observations*
HP	= histopatologi	PEO-1	= dalam satu hari setelah hari pajanan terakhir
LB	= *lung burden*	PEO-2	= dalam x minggu setelah hari pajanan terakhir
LL	= paru-paru kiri (*left lung*)	PEO-3	= dalam y minggu setelah hari pajanan terakhir (PEO-3 dapat sebelum atau setelah PEO-2
RL	= paru-paru kanan (*right lung*)	TBD	= *to be determined*

Merah = Harus dilakukan
Hijau= Opsional

Catatan: Keberhasilan uji utama tergantung informasi yang diperoleh dari uji pendahuluan atau hasil uji sebelumnya. Semua uji kimia menggunakan Opsi A kecuali untuk aerosol padat sulit larut yang menggunakan Opsi B. GD 39 menjelaskan bagaimana peneliti dapat menyesuaikan kedua opsi tersebut untuk mengoptimasi penilaian bahaya dari uji kimia.

AAA. Skema Pengujian untuk Toksisitas Subkronis 90 Hari (aerosol padat sulit larut)



Catatan: [1]Kebutuhan untuk penambahan kelompok satelit pada PEO-2 dan/atau PEO-3, durasi dari interval pasca dan waktu PEO ditentukan oleh peneliti berdasarkan tujuan penelitian dan hasil uji pendahuluan dan/atau informasi relevan lainnya. Sebagai contoh, PEO-1,PEO-2 dan/atau PEO-3 digunakan ketika dibutuhkan beberapa pengukuran *lung burden* yang digunakan sebagai evaluasi *clearance kinetics* (lihat GD 39).

BAB V
PENUTUP

Dengan disusunnya Pedoman Uji Toksisitas Praklinik 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 Praklinik secara In Vivo, mendorong pengembangan produk baru dalam rangka penyediaan obat dan makanan yang aman bagi masyarakat.

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

TARUNA IKRAR