



BERITA NEGARA REPUBLIK INDONESIA

No.875, 2014

BPOM. Uji Toksisitas. Non Klinik. *In Vivo*.
Pedoman.

PERATURAN KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA
NOMOR 7 TAHUN 2014
TENTANG
PEDOMAN UJI TOKSISITAS NONKLINIK SECARA *IN VIVO*
DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA
KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA,

- Menimbang :
- a. bahwa untuk melaksanakan uji nonklinik yang baik dan benar diperlukan adanya pedoman pelaksanaan berupa pedoman uji toksisitas nonklinik secara *in vivo*;
 - b. bahwa naskah pedoman uji toksisitas nonklinik secara *in vivo* yang disusun oleh Tim Penyusun Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik secara *in vivo* yang dibentuk berdasarkan Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor HK.04.01.73.04.11.3361 Tahun 2011 tentang Pembentukan Tim Penyusun Pedoman Uji Toksisitas Praklinik secara *in vivo* memenuhi syarat untuk ditetapkan sebagai sebuah pedoman;
 - c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a dan huruf b perlu menetapkan Peraturan Kepala Badan Pengawas

Obat dan Makanan tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik secara *in vivo*;

- Mengingat :
1. Undang-Undang Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5063);
 2. Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2012 tentang Pangan (Lembaran Negara Tahun 2012 Nomor 227, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5360);
 3. Peraturan Pemerintah Nomor 72 Tahun 1998 tentang Pengamanan Sediaan Farmasi dan Alat Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1998 Nomor 138, Tambahan Lembaran Negara Nomor 3781);
 4. Peraturan Pemerintah Nomor 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2004 Nomor 107, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4424);
 5. Keputusan Presiden Nomor 103 Tahun 2001 tentang Kedudukan, Tugas, Fungsi, Kewenangan, Susunan Organisasi, dan Tata Kerja Lembaga Pemerintah Non Departemen sebagaimana telah beberapa kali diubah terakhir dengan Peraturan Presiden Nomor 3 Tahun 2013;
 6. Keputusan Presiden Nomor 110 Tahun 2001 tentang Unit Organisasi dan Tugas Eselon I Lembaga Pemerintah Non Departemen sebagaimana telah beberapa kali diubah terakhir dengan Peraturan Presiden Nomor 4 Tahun 2013;
 7. Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 02001/SK/KBPOM Tahun 2001 tentang Organisasi dan Tata Kerja Badan Pengawas Obat dan Makanan sebagaimana telah diubah dengan Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor HK.00.05.21.4231 Tahun 2004;

MEMUTUSKAN:

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

BAB I

KETENTUAN UMUM

Pasal 1

Memberlakukan pedoman uji toksisitas nonklinik secara *in vivo* sebagaimana tercantum dalam Lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan ini.

BAB II

RUANG LINGKUP

Pasal 2

Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik secara *in vivo* dalam Peraturan ini meliputi:

- a. uji toksisitas akut oral;
- b. uji toksisitas subkronik oral;
- c. uji toksisitas kronik oral;
- d. uji teratogenesis;
- e. uji sensitisasi kulit;
- f. uji iritasi mata;
- g. uji iritasi akut dermal;
- h. uji iritasi mukosa vagina;
- i. uji toksisitas akut dermal; dan
- j. uji toksisitas subkronik dermal.

BAB III

PENERAPAN PEDOMAN

Pasal 3

Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik secara *in vivo* digunakan sebagai acuan dalam pelaksanaan kegiatan uji keamanan pengembangan obat baru, obat tradisional, kosmetik, suplemen kesehatan, dan pangan.

BAB IV
KETENTUAN PENUTUP

Pasal 4

Peraturan Kepala ini mulai berlaku pada tanggal diundangkan.

Agar setiap orang mengetahuinya, memerintahkan pengundangan Peraturan Kepala ini dengan penempatannya dalam Berita Negara Republik Indonesia.

Ditetapkan di Jakarta
pada tanggal 17 Juni 2014
KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN
MAKANAN REPUBLIK INDONESIA,

ROY A. SPARRINGA

Diundangkan di Jakarta
pada tanggal 25 Juni 2015
MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
REPUBLIK INDONESIA,

AMIR SYAMSUDIN

LAMPIRAN
PERATURAN KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA
NOMOR 7 TAHUN 2014
TENTANG
PEDOMAN UJI TOKSISITAS NONKLINIK SECARA *IN VIVO*

BAB I

PENDAHULUAN

Bahaya akibat pemaparan 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, dan toksisitas subkronis dermal. Pemilihan uji tersebut, tergantung dari tujuan penggunaan suatu zat dan kemungkinan terjadinya risiko akibat pemaparan 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 uji toksisitas yang telah dilakukan di Pusat Riset Obat dan Makanan Badan POM RI yang berpedoman pada peraturan dan tata cara uji toksisitas dari WHO (tahun 2000), buku-buku

pedoman resmi tentang uji toksisitas yang berlaku diberbagai negara termasuk Indonesia, serta pengetahuan dan pengalaman masing-masing staf Bidang Toksikologi Pusat Riset Obat dan Makanan yang diperoleh sewaktu mempelajari uji toksisitas bersama beberapa tenaga ahli. Pedoman ini meliputi uji toksisitas akut oral, toksisitas subkronis oral, toksisitas kronis oral, teratogenesis, sensitisasi kulit, iritasi mata, iritasi akut dermal, iritasi mukosa vagina, toksisitas akut dermal dan toksisitas subkronis dermal.

Pedoman ini disusun dengan tujuan agar dapat digunakan sebagai pedoman uji toksisitas nonklinis dalam pengembangan obat, obat tradisional, kosmetik, dan produk komplemen serta pangan dan bahan berbahaya, oleh institusi pendidikan dan penelitian, Industri yang terkait dengan pengembangan produk, serta pihak-pihak lain yang terkait.

BAB II

UJI TOKSISITAS

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 pemaparan 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 pemaparan pada manusia.

Faktor-faktor yang menentukan hasil uji toksisitas secara *in vivo* dapat dipercaya adalah: pemilihan spesies hewan uji, galur dan jumlah 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 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 mati selama percobaan dan yang hidup sampai akhir percobaan diotopsi 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 pemaparan suatu zat secara akut, memperoleh informasi awal yang dapat digunakan untuk menetapkan tingkat dosis, merancang uji toksisitas selanjutnya, memperoleh nilai LD₅₀ suatu bahan/ sediaan, serta penentuan penggolongan bahan/ sediaan dan pelabelan.

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 pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok selama 28 atau 90 hari, bila diperlukan ditambahkan kelompok satelit untuk melihat adanya efek tertunda atau efek yang bersifat *reversibel*. Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama periode pemberian sediaan uji, bila belum melewati periode *rigor mortis* (kaku) segera diotopsi, dan organ serta jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup diotopsi 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 pemaparan 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.

C. UJI TOKSISITAS KRONIS ORAL

Uji toksisitas kronis oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji secara berulang sampai seluruh umur hewan. Uji toksisitas kronis pada prinsipnya sama dengan uji toksisitas subkronis, tetapi sediaan uji diberikan selama tidak kurang dari 12 bulan. Tujuan dari uji toksisitas kronis oral adalah untuk mengetahui profil efek toksik setelah pemberian sediaan uji secara berulang selama waktu yang panjang, untuk menetapkan tingkat dosis yang tidak menimbulkan efek toksik (NOAEL). Uji toksisitas kronis harus dirancang sedemikianrupa sehingga dapat diperoleh informasi toksisitas secara umum meliputi efek neurologi, fisiologi, hematologi, biokimia klinis dan histopatologi.

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.

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 topikal untuk membentuk respon imun, kemudian dilakukan uji tantang (*challenge test*). Tingkat dan derajat reaksi kulit dinilai berdasarkan skala *Magnusson* dan *Kligman*.

F. UJI IRITASI MATA

Uji iritasi mata adalah suatu uji pada hewan uji (kelinci albino) untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemaparan sediaan uji pada mata. Prinsip uji iritasi mata adalah 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. Tujuan uji iritasi mata adalah untuk memperoleh informasi adanya kemungkinan bahaya yang timbul pada saat sediaan uji terpapar pada mata dan membran mukosa mata.

G. UJI IRITASI AKUT DERMAL

Uji iritasi akut dermal adalah suatu uji pada hewan (kelinci albino) untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemaparan sediaan uji pada dermal selama 3 menit sampai 4 jam. Prinsip uji iritasi akut dermal adalah pemaparan sediaan uji dalam dosis tunggal pada kulit hewan uji dengan area kulit yang tidak diberi perlakuan berfungsi sebagai kontrol. Derajat iritasi dinilai pada interval waktu tertentu yaitu pada jam ke 1, 24, 48 dan 72 setelah pemaparan sediaan uji dan untuk melihat reversibilitas, pengamatan dilanjutkan sampai 14 hari. Tujuan uji iritasi akut dermal adalah untuk menentukan adanya efek iritasi pada kulit serta untuk menilai dan mengevaluasi karakteristik suatu zat apabila terpapar pada kulit.

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 kedalam lapisan mukosa vagina hewan uji selama tidak kurang dari 5 kali pemaparan dengan selang waktu antar pemaparan 24 jam. Selama pemaparan, jaringan mukosa vagina diamati dan diberi skor terhadap

kemungkinan adanya eritema, eksudat dan udem. Setelah selesai pemaparan hewan uji dikorbankan dan diambil jaringan mukosa vaginanya untuk dievaluasi secara histopatologi. Tujuan uji iritasi mukosa vagina adalah untuk mengevaluasi keamanan dari alat-alat kesehatan yang kontak dengan mukosa vagina.

I. UJI TOKSISITAS AKUT DERMAL

Uji toksisitas akut dermal adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemaparan 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 pemaparan 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 absorpsi pada kulit.

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 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 diotopsi, organ dan jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup diotopsi 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 pemaparan sediaan uji melalui kulit secara berulang dalam jangka waktu tertentu, mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas setelah pemaparan sediaan uji melalui kulit secara berulang dalam jangka waktu tertentu.

K. DAFTAR PUSTAKA

- Darelanko, Michael J, Hollinger, and Mannfred A., 1995. Handbook of Toxicology 2nd edition. CRC Press.
- Doyle A, and Griffiths JB., 2000. Cell and Tissue Culture for Medical Research, Chichester: John Wiley & Sons.
- Redbook FDA, 2000. Chapter IV.C.9.b.: Guidelines for Developmental Toxicity Studies, FDA.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1996. Health Effects Test Guidelines OPPPTS 870.1000 Acute Oral Toxicity-Background, EPA.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1996. Health Effects Test guidelines OPPTS 870.3100.90 – Day Oral Toxicity, EPA.
- World Health Organization, 2000. Principle of Testing of Dug of Teratogenicity, WHO Tech. Rep. 364, Geneva, WHO.
- World Health Organization, 1998. Teratogenicity Study. Geneva; http://ecb.jrg.it/Document/testing-method/annexv_B31, diakses tanggal 14 Mei 2009.

BAB III**KETENTUAN-KETENTUAN UMUM PADA UJI TOKSISITAS****A. 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 tanaman obat memerlukan informasi berikut:
 - a. Nama latin dan nama daerah tanaman
 - b. Deskripsi daerah penanaman
 - c. Bagian tanaman yang digunakan
 - d. Pemerian simplisia
 - e. Cara pembuatan dan penanganan simplisia
 - f. Kandungan kimia simplisia

B. PENYIAPAN SEDIAAN UJI

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
 - a. Jika sediaan uji larut dalam air, sediaan uji harus dibuat dalam bentuk larutan dalam air.
 - b. Bila sediaan uji tidak larut dalam air, sediaan uji dibuat dalam bentuk suspensi menggunakan gom arab 3 - 5%, CMC (*carboxy methyl cellulose*) 0,3 - 1,0% atau dengan zat pensuspensi lain yang inert secara farmakologi.

- c. Bila tidak dapat dilakukan dengan cara – cara tersebut diatas, sediaan uji dilarutkan dalam minyak yang tidak toksik, misalnya minyak zaitun atau minyak jagung.
2. Campuran pada makanan
Pada uji toksisitas dengan pemberian berulang seperti pada uji toksisitas subkronis, dengan pertimbangan kepraktisan, sediaan uji dapat diberikan dengan mencampur dalam makanan atau minuman hewan uji. Dosis yang diberikan harus tetap, berdasarkan berat badan dan perhitungan jumlah makanan dan minuman yang dikonsumsi setiap hari.
3. Sediaan uji simplisia tanaman obat
Pembuatan sediaan uji simplisia tanaman obat dibuat seperti penggunaan pada manusia atau cara lain yang sesuai, misalnya penyarian dengan etanol. Penyarian menggunakan air dapat dilakukan dengan cara diseduh, direbus atau dengan cara penyarian yang lain selama dapat menjamin tersarinya kandungan simplisia secara sempurna. Pada pemekatan untuk mencapai dosis yang diinginkan, maka suhu pemanasan tidak boleh menyebabkan berkurangnya kandungan zat berkhasiat. Simplisia yang mengandung minyak atsiri, penyiapan dan pemekatan sediaan uji dilakukan dalam wadah tertutup dan dilakukan penyaringan setelah dingin. Penyarian dengan menggunakan etanol dapat dilakukan dengan cara dingin, misalnya maserasi, perkolasi, atau dengan cara panas misalnya direbus, 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.

C. DOSIS UJI

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.

D. 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.

E. CARA PEMBERIAN SEDIAAN UJI

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

F. 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.

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

G. KONDISI RUANGAN DAN PEMELIHARAAN HEWAN UJI

Ruangan yang digunakan untuk percobaan hendaknya memenuhi persyaratan suhu, kelembaban, cahaya dan kebisingan yang sesuai dengan kebutuhan hidup hewan uji, yaitu suhu ruangan diatur menjadi $22^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$, dengan kelembaban relatif 30–70%, 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*).

Hewan dipelihara dalam kandang yang terbuat dari material yang kedap air, kuat dan mudah dibersihkan, ruang pemeliharaan bebas dari kebisingan. Luas area kandang per ekor hewan menurut *Cage Space Guidelines For Animals Used In Biomedical Research* (2008) sebagai berikut:

1. Mencit (berat 15 – 25 g) : luas alas kandang 77,4 cm², tinggi 12,7 cm
2. Tikus (berat 100 – 200 g) : luas alas kandang 148,4 cm², tinggi 17,8 cm .
3. Kelinci (berat 2 – 4 kg) : luas alas kandang 270 cm², tinggi 40,64 cm .
4. Marmut (berat 300 – 350 g) : luas alas kandang 387 cm², tinggi 17,18 cm .

H. CARA MENGORBANKAN HEWAN UJI

Ada beberapa cara mengorbankan hewan uji pada uji toksisitas; pada prinsipnya hewan uji dikorbankan sesuai dengan kaidah-kaidah cara dan teknik pengorbanan hewan sesuai dengan *ethical clearance* deklarasi Helsinki serta tidak mempengaruhi hasil uji toksisitas.

1. *Eutanasi*

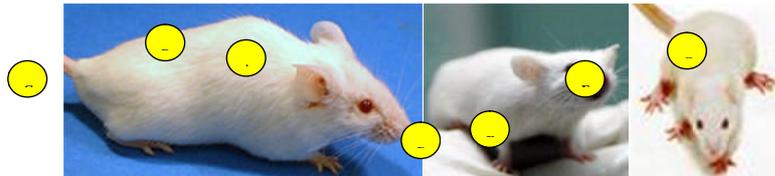
Sebelum hewan uji dikorbankan, dilakukan anestesi terlebih dahulu. Hewan dipegang secara hati-hati tanpa menimbulkan rasa takut, lalu hewan di korbankan dengan salah satu teknik mengorbankan hewan di suatu tempat terpisah dan dijaga agar tidak ada hewan hidup di sekitarnya.

2. Teknik mengorbankan hewan uji ada beberapa cara antara lain :

- a. Cara dislokasi leher untuk hewan kecil seperti mencit, tikus.
- b. Cara anestesi secara inhalasi atau penyuntikan.
- c. Cara pengeluaran darah melalui vena jugularis atau arteri karotis.

I. CARA PENANDAAN HEWAN UJI

Penandaan hewan uji dilakukan dengan cara memberikan larutan asam pikrat 10% dalam alkohol. Penandaan dilakukan dengan tujuan membedakan antara hewan satu dengan yang lainnya. Penandaan biasanya dilakukan seperti pada Gambar 1 dan Tabel 2.



Gambar 1. Tempat penandaan hewan uji pada beberapa bagian tubuh hewan

Tabel 2. 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

J. 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 ke dalam 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



Gambar 3. Cara memegang tikus pada pemberian sediaan uji secara oral



Gambar 4. Cara memegang kelinci

K. ANALISIS DATA

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

L. PELAPORAN

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

M. ETHICAL CLEARANCE

Pada setiap pengujian yang menggunakan sampel dari hewan perlu dibuat *ethical clearance* dari komisi etik.

N. DAFTAR PUSTAKA

- Darelanko, Michael J, Hollinger, and Mannfred A., 1995. Handbook of Toxicology 2nd edition. CRC Press.
- Doyle A and Griffiths JB., 2000. Cell and Tissue Culture for Medical Research, Chichester: John Wiley & Sons.
- Fao Corporate Document Repository,2010, *A Manual For Primary Animal Health Care Worker*, <http://www.fao.org/docrep/t0690/t0690eOa.htm>
- Redbook FDA, 2000. Chapter IV.C.9.b.: Guidelines for Developmental Toxicity Studies, FDA.
- Research Animal Resources (RAR), *Cage Space Guidelines For Animals Used In Biomedical Research*, <http://www.ahc.umn.edu/rar/cagespace.html>
- U.S. Environmental Protection Agency, 1996. Health Effects Test Guidelines OPPPTS 870.1000 Acute Oral Toxicity-Background, EPA.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1996. Health Effects Test guidelines OPPTS 870.3100.Subchronic 90 – Day Oral Toxicity, EPA.
- World Health Organization, 2000, Principle of Testing of Dug of Teratogenicity, WHO Tech. Rep. 364, Geneva.

BAB IV
PEDOMAN UJI

A. TOKSISITAS AKUT ORAL

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

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 3 ini. Kriteria penggolongan menurut OECD (2001) digunakan untuk penentuan kategori toksisitas akut bahan kimia seperti pestisida serta untuk pelabelannya.

Tabel 3. Kriteria penggolongan sediaan uji menurut OECD (pada tikus)

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

2000	≥1 ekor dengan gejala toksisitas dan atau tidak ada kematian	5
	Tidak ada gejala toksisitas	5/ <i>unclassified</i>

(Sumber: OECD, 2001)

Sedangkan untuk obat, obat tradisional bahan lainnya (*Generally Recognized As Safe/GRAS*) seperti bahan pangan, penentuan kategori toksisitas akut digunakan penggolongan klasifikasi seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. Kriteria penggolongan sediaan uji

Tingkat Toksisitas	LD ₅₀ (pada tikus)	oral	Klasifikasi
1	≤ 1 mg/kg		Sangat toksik
2	1-50 mg		Toksik
3	50-500 mg		Toksik sedang
4	500-5000 mg		Toksik ringan
5	5-15 g		Praktis tidak toksik
6	≥ 15 g		Relatif tidak membahayakan

(Hodge dan Sterner, 1995)

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 kematian hewan uji sebagai parameter akhir. Hewan yang mati selama percobaan dan yang hidup sampai akhir percobaan diotopsi untuk dievaluasi adanya gejala-gejala toksisitas dan selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ.

2. TUJUAN

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

3. METODE UJI TOKSISITAS AKUT

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

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

3.a. METODE KONVENSIONAL

3.a.1. PROSEDUR

3.a.1.1 Hewan Uji dan Jumlah

Hewan yang digunakan adalah rodensia tikus putih (strain *Sprague Dawley* atau *Wistar*) atau mencit (strain *ddY* atau *BALB/c* dan lain-lainnya). Syarat hewan uji adalah sehat, umur 5-6 minggu untuk mencit, 8-12 minggu untuk tikus. Sekurang-kurangnya 3 kelompok yang masing-masing kelompok

terdiri atas 5 ekor dengan jenis kelamin sama (jantan atau betina). 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. Jika digunakan hewan uji berkelamin betina, maka hewan uji tersebut harus nullipara dan tidak sedang bunting.

3.a.1.2. Dosis Uji

Sekurang-kurangnya digunakan 3 dosis berbeda. Dosis terendah adalah dosis tertinggi yang sama sekali tidak menimbulkan kematian, sedangkan dosis tertinggi adalah dosis terendah yang menimbulkan kematian 100 %. Dengan interval dosis yang mampu menghasilkan rentang toksisitas dan angka kematian. Dari data ini akan diperoleh suatu kurva dosis-respon yang dapat digunakan untuk menghitung nilai LD₅₀.

3.a.1.3. Batas Uji

Bila hingga dosis 5000 mg/kg BB (pada tikus) tidak menimbulkan kematian, maka uji tidak perlu dilanjutkan dengan menggunakan dosis bahan uji yang lebih tinggi.

3.a.1.4. Penyiapan Sediaan uji

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

3.a.1.5. Volume Pemberian Sediaan Uji

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). Jumlah 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 (*aqueous*) dapat diberikan hingga 2 mL/ 100 g berat badan. Tergantung dari formulasi bahan uji, pemilihan cairan untuk suspensi/emulsi yang *aqueous* lebih dianjurkan dari pada larutan suspensi/emulsi yang larut dalam minyak (minyak jagung) dan apabila menggunakan pelarut *non aqueous* maka karakteristik toksisitas cairan pembawa sudah harus diketahui.

3.a.1.6. Penyiapan Sediaan Uji

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

3.a.1.7. Pemberian Sediaan uji

Hewan uji harus dipuasakan sebelum diberikan perlakuan (tikus dipuasakan selama 14-18 jam, 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.

3.a.1.8. Pengamatan

Pengamatan dilakukan tiap hari selama sekurang-kurangnya 14 hari terhadap sistem kardiovaskuler, pernafasan, somatomotor, kulit dan bulu, mukosa, mata dsb. Perhatian khusus diberikan akan adanya tremor, kejang, salivasi, diare, letargi, lemah, tidur dan koma. Pengamatan meliputi waktu timbul dan hilangnya gejala toksik serta saat terjadinya kematian. Hewan uji yang sekarat dikorbankan dan dimasukkan dalam perhitungan sebagai hewan yang mati. Hewan ditimbang sedikitnya 2 kali dalam 1 minggu.

3.a.2. Pengumpulan dan Analisis Data

3.a.2.1. Pengumpulan Data

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

3.a.2.2. Analisis Data

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

3.b. 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.b.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 (dosis dapat ditambah hingga 5000 mg/kg). 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.b.2. PROSEDUR

3.b.2.1. Penyiapan Hewan Uji

Hewan yang digunakan adalah rodensia tikus putih (strain *Sprague Dawley* atau *Wistar*) atau mencit (*strain ddY* atau *BALB/c* dan lain-lainnya). Umumnya digunakan 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 permulaan 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 sekurang-kurangnya 5 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 cairan untuk suspensi/emulsi yang *aqueous* lebih dianjurkan dari

pada larutan suspensi/emulsi yang larut dalam minyak (minyak jagung) dan apabila menggunakan pelarut *non aqueous* 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 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. 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. 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 BB sebagai dosis yang diharapkan dapat menimbulkan efek toksik (Lampiran 1, 2). Pemeriksaan menggunakan dosis 5000 mg/kg 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 BB. 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 BB, sehingga nilai *cutt-off* LD₅₀ adalah 5 mg/kg BB (masuk kategori 1 GHS) maka penelitian sudah harus dihentikan tanpa perlu melakukan uji utama. Namun, jika diperlukan penegasan nilai LD₅₀ maka prosedur tambahan dapat dilakukan sbb: Pada hewan uji kedua diberikan dosis 5 mg/kg. 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 BB 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. Berdasarkan Lampiran 2, maka bahan uji masuk kelompok A (kematian 2 atau lebih), dan berlaku klasifikasi pada dosis 5 mg/kgBB (Kategori 1 jika ada 2 atau lebih kematian atau Kategori 2 jika hanya ada 1 kematian).

3.b.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 (Lampiran 3, 4). 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. Sehubungan dengan *animal welfare*, bila akan menggunakan dosis diatas 5000 mg/kg, dipertimbangkan bahwa dosis tersebut sangat relevan dengan kepentingan untuk melindungi manusia, hewan atau lingkungan.

3.b.2.6. Uji Batas

Jika pada uji pendahuluan tidak ada kematian pada tingkat dosis 2000 mg/kg dan pada uji utama hanya 1 ekor atau tidak ada hewan yang mati pada tingkat dosis 2000 mg/kg, maka tidak perlu diberikan dosis melampaui 2000 mg/kg.

3.b.2.7. Pengamatan

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

Pengamatan tambahan perlu dilakukan jika hewan menunjukkan gejala toksisitas secara terus-menerus. Pengamatan yang dilakukan termasuk pada: kulit, bulu, mata, membran mukosa dan juga sistem pernafasan, sistem

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. 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 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.2.8. 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.c. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

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

4. DAFTAR PUSTAKA

Darelanko, Michael J., and Hollinger, Mannfred A., 1995. Handbook of Toxicology, 2nd edition, CRC Press.

Organization for Economic Cooperation and Development, 2001. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 401, 407 – 408, OECD.

Redbook 2000, 2003. Toxicological Principals for The Safety of Food Ingredients; Guidelines for Reporting The Result of oxicity Studies, U.S. FDA.

U.S.Environmental Protection Agency, 1998. Health Effects Test Guidelines OPPPTS 870.1100 Acute Oral Toxicity, EPA.

Wallum, E., 1998. Acute Oral Toxicity, Environmental Health Perspectives, 106, 2:497–503.

B. TOKSISITAS SUBKRONIS ORAL PADA RODENSIA

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 diotopsi, organ dan jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup diotopsi 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 pemaparan 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 pemaparan sediaan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu.

3. JENIS UJI TOKSISITAS SUBKRONIS:

3.a. 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 apakah:

- a. dalam bentuk sekali pakai.
- b. berulang dalam waktu kurang dari satu minggu.

3.b. 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 28 HARI PADA RODENSIA

3.a.1. PROSEDUR

3.a.1.1. Hewan Uji dan Jumlah

Hewan yang digunakan adalah rodensia tikus putih (strain Sprague Dawley atau Wistar) atau mencit (strain ddY atau BALB/c dan lain-lainnya). Syarat hewan uji adalah sehat, umur 6-8 minggu. Masing-masing kelompok dosis menggunakan hewan minimal 10 ekor yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina untuk setiap kelompok dosis. Selain itu jika perlu dapat disediakan juga 2 kelompok tambahan (grup satelit) minimal 10 hewan per kelompok yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan dan 5 ekor hewan betina untuk kelompok kontrol dan kelompok dosis tinggi. Pengamatan reversibilitas pada kelompok satelit dilakukan selama 14 hari setelah akhir pemberian sediaan uji. Sebelum percobaan dimulai, hewan diaklimatisasi di ruang percobaan selama lebih kurang 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.

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). Dosis sediaan uji yang paling tinggi harus menimbulkan efek toksik tetapi tidak menimbulkan kematian atau gejala toksisitas yang berat; dosis menengah menimbulkan gejala toksik yang lebih ringan sedangkan dosis yang paling rendah tidak menimbulkan gejala toksik (NOAEL).

3.a.1.3. Batas Uji

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

3.a.1.4. Penyiapan Sediaan uji

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

3.a.1.5. Cara Pemberian dan Volume Pemberian

Pada dasarnya cara pemberian sediaan uji harus disesuaikan dengan cara pemberian atau pemaparan 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 atau minimal 5 hari dalam 1 minggu selama 28 hari.

3.a.1.7. Pengamatan

Pengamatan terjadinya gejala-gejala toksik dan gejala klinis yang berupa perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa, sekresi, ekskresi, 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.

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

Monitoring kenaikan berat badan dilakukan seminggu dua kali. Hewan ditimbang setiap hari untuk menentukan volume sediaan uji yang akan diberikan. Sedangkan jumlah makanan yang dikonsumsi ditimbang dua hari sekali.

3.a.1.9. Pengambilan Darah

Pada akhir percobaan darah diambil menggunakan alat suntik steril dan selalu dijaga agar tidak terkena air (untuk menghindari terjadinya hemolisa). Setelah hewan di anestesi dengan eter darah diambil dari vena jugularis secara perlahan-lahan menggunakan alat suntik steril sebanyak 3–5 mL, satu alat suntik digunakan untuk satu hewan. Sebanyak 0,5 mL darah dimasukkan kedalam tabung mikrosentrifus yang telah diisi antikoagulan (EDTA) sebanyak 10 μ L untuk pemeriksaan hematologi, sebanyak 0,5 mL darah untuk pembuatan apusan darah pada penetapan deferensial leukosit. Sisanya dimasukkan kedalam tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian dipindahkan kedalam tangas es tidak lebih dari 20 menit dan segera disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan dalam lemari beku (-20°C) untuk pemeriksaan biokimia klinis.

3.a.1.10. Pemeriksaan Hematologi

Pemeriksaan hematologi (Lampiran 5) meliputi: konsentrasi hemoglobin, jumlah eritrosit (*RBC/Red Blood Cell*), jumlah leukosit (*WBC/White Blood Cell*), diferensial leukosit, hematokrit, jumlah platelet (trombosit), perhitungan tetapan darah yaitu: MCV (*Mean Corpuscular Volume*), MCH (*Mean Corpuscular Hemoglobin*), MCHC (*Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*) dan penetapan deferensial leukosit (Lampiran 6).

3.a.1.11. Pemeriksaan Biokimia Klinis

Pemeriksaan biokimia klinis (Lampiran 7 sampai 22) menurut OECD (2001) meliputi: natrium, kalium, glukosa, total-kolesterol, trigliserida, nitrogen urea, kreatinin, total-protein, albumin, GOT (glutamat oksaloasetat transaminase), GPT (glutamat piruvat transaminase), total-bilirubin, alkaline fosfatase, gamma glutamil trans-peptidase, LDH (laktat dehidrogenase), asam empedu (*bile acids*). Sedangkan menurut WHO (2000) pemeriksaan biokimia klinis meliputi: fungsi hati (GOT, GPT, Gamma GT) dan fungsi ginjal (nitrogen urea, kreatinin, total-bilirubin). Parameter utama minimal yang harus diperiksa adalah nitrogen urea, kreatinin, GOT dan GPT.

3.a.1.12. Pengamatan Makropatologi

Hewan yang telah dikorbankan harus segera diotopsi 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. 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

Organ yang diperiksa secara histopatologi meliputi: otak, pituitari, tiroid, timus, paru-paru, jantung, hati, ginjal, limpa, adrenal, pankreas, testis, vesikula seminalis, kantong kemih, indung telur, uterus, epididimis, usus, limfo nodus, saraf tepi, lambung, tulang dada, tulang paha, sumsum tulang belakang 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% dan dibuat preparat histopatologi (Lampiran 23) kemudian diperiksa dibawah mikroskop.

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 dan galur yang digunakan
 - b. Nama, bentuk dan cara pemberian sediaan uji
 - c. Kondisi pemeliharaan hewan: ukuran kandang, jumlah hewan perkandang, bahan pembuat kandang (aluminium, fiber atau bahan lain).
4. Hasil:
 - a. Efek toksik yang terjadi untuk setiap dosis dan jenis kelamin
 - b. Waktu terjadinya gejala-gejala toksik dan kematian
 - c. Data berat badan (dua kali dalam minggu) dan makanan yang konsumsi
 - d. Hasil pemeriksaan hematologi
 - e. Hasil pemeriksaan biokimia klinis
 - f. Penemuan hasil pemeriksaan makropatologi dan histopatologi

- g. Bobot organ absolut dan relatif
 - h. Analisis statistik antara lain menggunakan ANOVA
5. Pembahasan
 6. Kesimpulan
 7. Daftar Pustaka

3.b. TOKSISITAS SUBKRONIS ORAL 90 HARI PADA RODENSIA

3.b.1. PROSEDUR

3.b.1.1. Hewan Uji dan Jumlah

Hewan yang digunakan adalah rodensia tikus putih (strain Sprague Dawley atau Wistar) atau mencit (strain ddY atau BALB/c dan lain-lainnya). Syarat hewan uji adalah sehat, umur 6-8 minggu. Masing-masing kelompok dosis menggunakan hewan minimal 20 yang terdiri dari 10 ekor jantan dan 10 ekor betina untuk setiap kelompok dosis. Selain itu jika perlu dapat disediakan juga 2 kelompok tambahan (grup satellite) minimal 20 hewan yang terdiri dari 10 ekor jantan dan 10 ekor betina untuk kelompok kontrol dan kelompok dosis tinggi. Pengamatan reversibilitas pada kelompok satelit dilakukan selama 28 hari setelah akhir pemberian sediaan uji. Sebelum percobaan dimulai, hewan diaklimatisasi di ruang percobaan selama lebih kurang 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.

3.b.1.2. Dosis Uji

Sekurang-kurangnya digunakan 3 kelompok dosis, 1 kelompok kontrol dan 2 kelompok satelit (kelompok dosis tinggi dan kelompok kontrol) untuk setiap jenis kelamin. 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)

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 pemaparan 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 atau minimal 5 hari dalam 1 minggu selama 90 hari.

3.b.1.7. Pengamatan

Pengamatan terjadinya gejala-gejala toksik dan gejala klinis yang berupa perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa, sekresi, ekskresi, perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur), kejang dsb. dilakukan setiap hari selama 90 hari. Sedangkan untuk kelompok satellit pengamatan dilanjutkan selama 28 hari kemudian, namun tanpa pemberian sediaan uji untuk mendeteksi proses penyembuhan kembali dari pengaruh toksik.

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

Monitoring kenaikan berat badan dilakukan seminggu dua kali. Hewan ditimbang setiap hari untuk menentukan volume sediaan uji yang akan diberikan. Sedangkan jumlah makanan yang dikonsumsi ditimbang dua hari sekali.

3.b.1.9. Pengambilan Darah

Darah diambil menggunakan alat suntik steril dan selalu dijaga agar tidak terkena air (untuk menghindari terjadinya hemolisis). Setelah hewan di anestesi dengan eter, darah diambil dari vena jugularis secara perlahan-lahan menggunakan alat suntik steril sebanyak 3–5 mL, satu alat suntik digunakan untuk satu hewan. Sebanyak 0,5 mL darah dimasukkan kedalam tabung mikrosentrifus yang telah diisi antikoagulan (EDTA) sebanyak 10 μ L untuk pemeriksaan hematologi, sebanyak 0,5 mL darah untuk pembuatan apusan darah pada penetapan deferensial leukosit. Sisanya dimasukkan kedalam tabung pemusing / tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) selama 10 menit, kemudian dipindahkan ke dalam tangas es tidak boleh kurang dari 20 menit dan segera dipusingkan / disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan dalam lemari beku (-20°C) untuk pemeriksaan biokimia klinis.

3.b.1.10. Pemeriksaan Hematologi

Pemeriksaan hematologi (Lampiran 5) meliputi: konsentrasi hemoglobin, jumlah eritrosit, jumlah leukosit, diferensial leukosit, hematokrit, jumlah platelet (trombosit), perhitungan tetapan darah yaitu: MCV, MCH, MCHC dan penetapan deferensial leukosit (Lampiran 6).

3.b.1.11. Pemeriksaan Biokimia Klinis

Pemeriksaan biokimia klinis (Lampiran 7 sampai 22) menurut OECD (2001) meliputi: natrium, kalium, glukosa, total-kolesterol, trigliserida, nitrogen urea, kreatinin, total-protein, albumin, GOT, GPT, total-bilirubin, alkaline fosfatase, gamma glutamil trans-peptidase, LDH, asam empedu. Sedangkan menurut WHO (2000) pemeriksaan biokimia klinis meliputi: fungsi hati (GOT, GPT, Gamma GT) dan fungsi ginjal (Nitrogen Urea, Kreatinin, Total-Bilirubin). Parameter utama yang harus diperiksa adalah glukosa, total-kolesterol, trigliserida, nitrogen urea, kreatinin, GOT dan GPT.

3.b.1.12. Pengamatan Makropatologi

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

3.b.1.13. 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.

3.b.1.14. Pemeriksaan Histopatologi

Organ yang diperiksa secara histopatologi meliputi: otak, pituitari, tiroid, timus, paru-paru, jantung, hati, ginjal, limpa, adrenal, pankreas, testis, vesikula seminalis, kantong kemih, indung telur, uterus, epididimis, usus, limfo nodus, saraf tepi, lambung, tulang dada, tulang paha, sumsum tulang belakang 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% dan dibuat preparat histopatologi (Lampiran 23) kemudian diperiksa dibawah mikroskop.

3.b.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.b.2. 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
 - c. Kondisi pemeliharaan hewan: ukuran kandang, jumlah hewan perkandang, bahan pembuat kandang (aluminium, fiber atau bahan lain).
4. Hasil:
 - a. Efek toksik yang terjadi untuk setiap dosis dan jenis kelamin
 - b. Waktu terjadinya gejala-gejala toksik dan kematian
 - c. Data berat badan (dua titik tiap minggu) dan makanan yang konsumsi
 - d. Hasil pemeriksaan hematologi
 - e. Hasil pemeriksaan biokimia klinis
 - f. Penemuan hasil pemeriksaan makropatologi dan histopatologi
 - g. Bobot organ absolut dan relatif
 - h. Analisa statistik menggunakan ANOVA
5. Pembahasan
6. Kesimpulan
7. Daftar Pustaka

4. DAFTAR PUSTAKA

- Darelanko, M.J., and Manfred, A.H., 2002. Handbook of Toxicology, Second Edition, CRC Press, USA.
- Oranization for Economic Cooperation and Development, 2001. Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, 407 – 408.
- United States Environmental Protection Agency, 1996. Health Effects Test guidelines OPPTS 870.3100.90 – Day Oral Toxicity (di akses tgl 20 Januari 2009).
- Wolrd Health Organization, 2000. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine, WHO MD, (diakses tgl 19 Januari 2009).

C. TOKSISITAS KRONIS ORAL PADA RODENSIA

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

1. PRINSIP

Sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji selama tidak kurang dari 12 bulan. 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 diotopsi, organ dan jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup diotopsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ maupun jaringan, serta dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis, histopatologi.

2. TUJUAN

Untuk memperoleh informasi adanya:

1. Efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas subkronis.
2. Karakterisasi toksisitas dari suatu sediaan uji yang dipaparkan dalam waktu lama dan berulang
3. Untuk menentukan NOAEL yaitu dosis yang tidak menimbulkan efek toksik

3. PROSEDUR

3.a. Hewan Uji dan Jumlah

Hewan yang digunakan adalah rodensia tikus putih (strain *Sprague Dawley* atau *Wistar*) atau mencit (*strain ddY* atau *BALB/c* dan lain-lainnya). Syarat hewan uji adalah sehat, umur 4-5 minggu (sesegera mungkin setelah *weaning* dan masa aklimatisasi). Masing-masing kelompok dosis menggunakan hewan minimal 40 ekor yang terdiri dari 20 ekor jantan dan 20 ekor betina untuk setiap kelompok

dosis, 20 ekor hewan yang terdiri dari 10 ekor jantan dan 10 ekor betina diotopsi pada bulan ke-6 (kelompok *ad interim*) untuk diperiksa hematologi, biokimia klinis dan histopatologi. Sebelum percobaan dimulai, hewan diaklimatisasi di ruang percobaan selama lebih kurang 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.

3.b. Dosis Uji

Sekurang-kurangnya digunakan 3 kelompok dosis yang berbeda, 1 kelompok kontrol dan kelompok *ad-interim* (semua dosis dan kelompok kontrol) untuk setiap jenis kelamin. 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.

3.c. Batas Uji

Bila pada dosis 1000 mg/kg berat badan tidak dihasilkan efek toksik, dosis tidak perlu dinaikkan lagi.

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 pemaparan 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 selama tidak kurang dari 12 bulan

3.g. Pengamatan

Pengamatan terjadinya gejala-gejala toksik dan gejala klinis yang berupa perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa, sekresi, ekskresi, perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur), kejang dilakukan setiap hari selama 12 bulan.

3.h. Monitoring Berat Badan dan Konsumsi Makanan

Monitoring kenaikan berat badan dilakukan seminggu 2 kali. Hewan ditimbang setiap hari untuk menentukan volume sediaan uji yang akan diberikan. Sedangkan jumlah makanan yang dikonsumsi ditimbang dua hari sekali.

3.i. Pengambilan Darah

Darah diambil menggunakan alat suntik steril dan selalu dijaga agar tidak terkena air (untuk menghindari terjadinya hemolisis). Setelah hewan dianestesi dengan eter darah diambil dari vena jugularis secara perlahan-lahan menggunakan alat suntik steril sebanyak 3–5 mL, satu alat suntik digunakan untuk satu hewan. Sebanyak 0,5 mL darah dimasukkan kedalam tabung mikrosentrifus yang telah diisi antikoagulan (EDTA) sebanyak 10 μ L untuk pemeriksaan hematologi, sebanyak 0,5 mL darah untuk pembuatan apusan darah. Sisanya dimasukkan kedalam tabung pemusing/tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian dipindahkan ke dalam tangas es tidak boleh kurang dari 20 menit dan segera dipusingkan/disentrifus

selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan dalam lemari beku (-20°C) untuk pemeriksaan biokimia klinis.

3.j. Pemeriksaan Hematologi

Pemeriksaan hematologi (Lampiran 5) meliputi: konsentrasi hemoglobin, jumlah eritrosit, jumlah leukosit, diferensial leukosit, hematokrit, jumlah platelet (trombosit), perhitungan tetapan darah yaitu: MCV, MCH, MCHC dan penetapan deferensial leukosit (Lampiran 6).

3.k. Pemeriksaan Biokimia Klinis

Pemeriksaan biokimia klinis (Lampiran 7 sampai 22) menurut OECD (2001) meliputi: natrium, kalium, glukosa, total-kolesterol, trigliserida, nitrogen urea, kreatinin, total-protein, albumin, GOT, GPT, total-bilirubin, alkaline fosfatase, gamma glutamil trans-peptidase, LDH, asam empedu. Sedangkan menurut WHO (2000) pemeriksaan biokimia klinis meliputi: fungsi hati (GOT, GPT, gamma GT) dan fungsi ginjal (nitrogen urea, kreatinin, total-bilirubin). Parameter utama minimal yang harus diperiksa adalah glukosa, total-kolesterol, trigliserida, nitrogen urea, kreatinin, GOT, dan GPT.

3.l. Pengamatan Makropatologi

Hewan yang telah dikorbankan harus segera diotopsi 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.

3.n. Pemeriksaan Histopatologi

Organ yang diperiksa secara histopatologi meliputi: otak, pituitari, tiroid, timus, paru-paru, jantung, hati, ginjal, limpa, adrenal, pankreas, testis, vesikula seminalis, kantong kemih, indung telur, uterus, epididimis, usus, limfo nodus, saraf tepi, lambung, tulang dada, tulang paha, sumsum tulang belakang 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% dan dibuat preparat histopatologi (Lampiran 23) kemudian diperiksa dibawah mikroskop.

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 dan galur yang digunakan
 - b. Nama, bentuk dan cara pemberian sediaan uji
 - c. Kondisi pemeliharaan hewan: ukuran kandang, jumlah hewan perkandang, bahan pembuat kandang (aluminium, fiber atau bahan lain).
4. Hasil:
 - a. Efek toksik yang terjadi untuk setiap dosis dan jenis kelamin
 - b. Waktu terjadinya gejala-gejala toksik dan kematian
 - c. Data berat badan (dua titik tiap minggu) dan makanan yang konsumsi

- d. Hasil pemeriksaan hematologi
 - e. Hasil pemeriksaan biokimia klinis
 - f. Penemuan hasil pemeriksaan makropatologi dan histopatologi
 - g. Bobot organ absolut dan relatif
 - h. Analisis statistik menggunakan ANOVA
5. Pembahasan
 6. Kesimpulan
 7. Daftar Pustaka

5. DAFTAR PUSTAKA

Darelanko, M.J., and Manfred, A.H., 2002. Handbook of Toxicology, Second Edition, CRC Press, USA.

Organization for Economic Cooperation and Development, 2008. Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, 407 – 408.

United States Environmental Protection Agency, 1996. Health Effects Test guidelines OPPTS 870.3100.90 – Day Oral Toxicity (di akses tgl 20 Januari 2009).

World Health Organization, 2000. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine, www.who.int/medicinedocs, (diakses tgl 19 Januari 2009).

World Health Organization, 1975, Technical Report Series No.563

D. TERATOGENISITAS

1. PRINSIP

Sediaan uji pada beberapa tingkat dosis diberikan kepada beberapa kelompok hewan selama paling sedikit masa organogenesis (hari ke 6 -15 pada rodensia (tikus dan mencit), hari ke 6-14 pada hamster dan hari ke 6-18 pada kelinci) dari kebuntingan, satu dosis perkelompok. Sehari sebelum waktu melahirkan induk dibedah, uterus diambil dan dibuka kemudian diperiksa, dilakukan evaluasi terhadap fetus (janin). Fetus diperiksa gambaran makroskopis fetusnya (kematian, abnormalitas morfologi maupun ukuran) dan gambaran mikroskopisnya (organ dalam dan kerangka).

2. TUJUAN

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

3. PROSEDUR

3.a. Hewan Uji

Pengujian teratogenisitas dapat menggunakan tikus, mencit, marmot dan kelinci sebagai hewan percobaan. Namun yang biasa digunakan adalah tikus untuk golongan rodensia dan kelinci untuk golongan non rodensia. Penggunaan tikus galur SD lebih disarankan karena galur ini memiliki anak lebih banyak. Kriteria hewan yang digunakan adalah betina perawan, sehat, umur 12 minggu untuk tikus, 8 minggu untuk mencit dan 5-6 bulan untuk kelinci. Hewan uji harus diaklimatisasi sedikitnya 1 minggu di ruang pengujian. Hewan uji yang digunakan harus seragam spesies, galur, sumber, berat dan umurnya. Hewan betina dikawinkan dengan hewan jantan yang sama species 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 (Lampiran 24). Pada saat karantina, setiap kandang tikus atau mencit diisi 5 ekor hewan, sedang pada saat dikawinkan kandang diisi 2 ekor jantan dewasa (umur 13 minggu) dan 3 ekor betina dewasa (umur 12 minggu) proestrus (masa prabirahi). Setiap betina yang terbukti telah kawin diletakkan dalam kandang individual.

3.b. Jumlah Hewan Uji

Digunakan sekurang-kurangnya 3 kelompok uji dan 1 kelompok kontrol, tiap kelompok uji dan kontrol terdiri dari minimal 20 ekor induk bunting untuk tikus, mencit dan marmot sedangkan untuk kelinci 12 ekor induk bunting. Kematian induk tidak boleh lebih dari 10 %.

3.c. Preparasi Sediaan Uji

Pemilihan bahan pembawa sediaan uji harus mempertimbangkan pengaruh bahan pembawa terhadap efek absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi dari sediaan uji; karena efek bahan pembawa kadang-kadang dapat mempengaruhi karakteristik toksik dari sediaan uji. Bahan pembawa yang digunakan tidak boleh mempunyai efek terhadap alat 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 kali pada saat yang lebih kurang sama waktunya.

Sebelum pemberian sediaan uji harus dilakukan uji pendahuluan untuk menetapkan dosis uji. Dosis tertinggi sebaiknya sedikit menginduksi efek toksik pada induk, misalnya menurunkan berat badan, tetapi tidak boleh menyebabkan kematian induk lebih dari 10 %. Dosis rendah tidak menunjukkan efek dan dosis tengah terletak diantara dosis tinggi dan dosis rendah. Kelompok kontrol diperlakukan sama dengan kelompok uji dan mengganti sediaan uji dengan bahan pembawa. Volume pemberian sediaan uji 1 mL/100 g berat badan, pada keadaan tertentu bila menggunakan bahan pembawa air volume pemberian

dapat ditingkatkan menjadi 2 mL/100 g berat badan, bila menggunakan minyak jagung sebagai pembawa volume pemberian tidak boleh lebih dari 0,4 mL/100 g berat badan. Variasi volume pemberian sediaan uji harus dihindari, konsentrasi sediaan uji diatur sedemikian rupa agar volume pemberian konstan.

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

3.e. Batas Uji

Bila sampai dosis 1000 mg/kg berat badan tidak memberikan efek toksik atau teratogenik pada embrio, maka dosis tidak perlu dinaikan lagi. Bila dosis tinggi pada penelitian pendahuluan menunjukkan efek toksik pada induk, tetapi tidak menunjukkan efek pada embrio, maka pengujian menggunakan dosis yang lebih tinggi tidak diperlukan.

3.f. Pelaksanaan Uji

- a. Sebelum pengujian dimulai hewan diaklimatisasi dalam ruang percobaan selama tidak kurang dari 1 minggu. Sebelum hewan dikawinkan dapat dibuat apusan vagina untuk menentukan masa birahi pada tikus betina (tahap proestrus) dengan cara seperti yang tertera pada Lampiran 24. 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 pada Lampiran 25.
- 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 pada Lampiran 26.
- d. Sediaan uji diberikan pada induk yang terbukti kawin selama masa organogenesis dan selama itu 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 diotopsi. Konsumsi makanan ditimbang 2 kali seminggu. Saat muncul dan lama gejala toksik harus diamati (seperti perubahan kulit, bulu, mata dan lapisan mukosa). Hewan yang mati selama pengujian segera dibedah

- e. Pada hari ke-20 untuk tikus, ke-18 untuk mencit dan ke-29 untuk kelinci, pembedahan induk dilakukan dengan cara seperti yang tertera pada Lampiran 27. 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 marmot sejumlah 1/3 dari fetus hidup dibuat preparat kerangka dengan cara seperti tertera pada Lampiran 28 dan diperiksa terhadap kelainan kerangka dengan cara seperti yang tertera pada Lampiran 29. Yang 2/3 digunakan untuk pemeriksaan jaringan lunak dengan cara seperti yang tertera pada Lampiran 30. Untuk kelinci, setiap fetus hidup digunakan untuk pemeriksaan jaringan lunak dan kerangka.

3.g. Data

Data yang dilaporkan adalah keadaan hewan secara individual dan dirangkum dalam bentuk tabel yang memperlihatkan data setiap kelompok uji. Data menunjukkan jumlah hewan pada awal pengujian; 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 keadaan induk dan fetus (eksternal, jaringan lunak dan kerangka). Pada penafsiran hasil pengujian teratogenisitas variasi jenis hewan harus dipertimbangkan. Pengujian dengan hewan tidak menjamin keamanan zat pada janin manusia.

4. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian harus berisi informasi sebagai berikut:

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

4. Hasil pengujian

a. Respon toksik dari induk

- Jumlah hewan diawal 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)
- Konsumsi pakan induk

b. Data fetus:

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

5. Analisis statistik menggunakan *Wilcoxon*.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Darelanko, M.J., and Manfred, A.H., 2002. Handbook of Toxicology, Second Edition, CRC Press, USA.
- Oranization for Economic Cooperation and Development. 2001. Prenatal Development Toxicity Study Guideline for the Testing of Chemical Proposal for Updating Guideline 414, OECD.
- World Health Organization, 2000. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine, WHO MD, (di akses tanggal 19 January 2009).
- World Health Organization, 2000. Principle of Testing of Drug of Teratogenecity, WHOTech. Rep. 364, Geneva.
- World Health Organization, 1998. Teratogenecity Study, http://ecb.jrg.it/Document/testing-method/annexv_B31 (diakses tanggal 24 Februari 2009).

E. SENSITISASI KULIT (Metode *Guinea-Pig Maximisation Test*)

Uji sensitisasi kulit yaitu suatu uji untuk mengidentifikasi suatu zat yang berpotensi menyebabkan sensitisasi kulit.

1. PRINSIP

Hewan uji diinduksi dengan dan tanpa *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) secara injeksi intradermal dan topikal untuk membentuk respon imun, kemudian dilakukan ujiantang (*challenge test*). Tingkat dan derajat reaksi kulit dinilai berdasarkan skala *Magnusson* dan *Kligman*.

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 albino (*guinea pig*) dewasa muda dan sehat, berat 300 – 500 g, jantan dan atau betina dan jika menggunakan hewan uji betina harus *nulliparous* dan tidak bunting. 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 sampai dengan tidak kurang dari 20 ekor untuk kelompok perlakuan dan 10 ekor untuk kelompok kontrol.

3.b. Dosis Uji

Dosis sediaan uji yang digunakan untuk induksi hendaknya dapat ditoleransi secara sistemik dan dosis tertinggi dapat menyebabkan iritasi kulit ringan sampai sedang. Sedangkan untuk ujiantang, dosis tertinggi hendaknya tidak

menyebabkan iritasi. Dosis yang tepat untuk uji ditentukan dengan uji pendahuluan menggunakan FCA 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 kurang lebih selama 5 hari dan hewan dikelompokkan secara acak. Hewan (marmut) dicukur bulunya 24 jam sebelum pengujian dimulai, untuk induksi intradermal dan topikal, pada daerah tengkuk (*intrascapular region*) ± 4 x 6 cm dan untuk uji tantang dicukur pada daerah punggung (*flank*) ± 5 x 5 cm. Penghilangan bulu dapat juga menggunakan bahan kimia perontok bulu, tapi harus dijaga agar tidak terjadi luka atau lecet pada kulit.

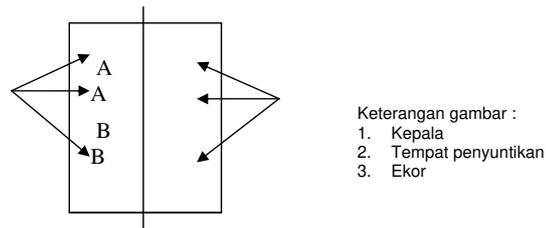
3.e. Uji Pendahuluan

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

a. Induksi intradermal (hari ke 0):

0.1 ml campuran FCA 50 % disuntikan dibagian tengkuk masing-masing marmut dengan pada daerah A, B, C seperti pada Gambar 5, penyuntikan daerah A dan B dilakukan dekat dengan kepala, sedangkan daerah C dekat ekor.

- b. Induksi topikal: berbagai konsentrasi sampel diaplikasikan pada daerah tengkuk marmut, bahan uji (berat 0,5 g atau 0,5 ml) ditaruh diatas kertas saring (2 x 4 cm) lalu ditempelkan diatas kulit yang telah dicukur selanjutnya ditutup dengan *occlusive dressing*, kemudian diperban dengan *elastic bandage*. Setelah 24 jam perban dibuka dan diamati. Untuk induksi topikal pada uji utama dipilih konsentrasi tertinggi yang tidak/sedikit menyebabkan eritema (skor 0 - 1), tapi tidak menimbulkan pengaruh buruk pada hewan. Sedang untuk ujiantang (*challenge*) dipilih konsentrasi tertinggi yang tidak memberikan eritema (skor 0) dengan penilaian menurut Tabel 5.



Gambar 5. Lokasi penyuntikan intradermal

Tabel 5. 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, 2002

3.f. Uji Utama

3.f.1. Fase Induksi Intradermal (hari ke 0)

Induksi Intradermal: bahan-bahan berikut ini disuntikan di bagian tengkuk masing-masing marmut

- Daerah A : 0.1 ml campuran *FCA 50% (FCA/NaCl 1:1 v/v)
- Daerah B : 0.1 ml sediaan uji dengan konsentrasi sesuai hasil uji pendahuluan.
- Daerah C : 0.1 ml campuran **sediaan uji : FCA 50% (1 : 1, v : v)
 - * FCA dilarutkan dengan NaCl fisiologis steril. Apabila sediaan uji tidak larut air, maka FCA diencerkan dengan pelarut yang sesuai.
 - ** Dosis sediaan uji pada daerah C sama dengan dosis pada daerah B

Terhadap kontrol dilakukan hal yang sama dan untuk kontrol negatif sampel diganti dengan pelarut.

3.f.2. Fase Induksi Topikal (hari ke 7)

Fase Induksi Topikal dilakukan 7 hari setelah fase induksi intradermal. Dua puluh empat jam sebelum perlakuan bagian tengkuk marmut dicukur lagi. Pada hari percobaan dioleskan 0,5 g untuk sediaan pasta dan 0,5 ml sediaan cair dengan dosis yang didapat dari hasil uji pendahuluan pada kertas saring ukuran 8 cm² (2 x 4 cm), kemudian kertas tersebut ditempelkan pada tengkuk masing-masing marmut sehingga menutupi tempat penyuntikan intradermal dan ditutup dengan *occlusive dressing* selanjutnya dibalut dengan *elastic bandage*, setelah 48 jam dibuka dan diamati. Apabila tidak memperlihatkan iritasi, maka induksi topikal diulang dan 24 jam sebelumnya bagian tengkuk diolesi dengan 0,5 mL dodesilsulfat natrium 10 % dan ditutup dengan *occlusive dressing* kemudian dibalut dengan *elastic bandage*, setelah 48 jam, dibuka dan diamati. Hal yang sama dilakukan terhadap kontrol, tetapi sampel diganti dengan pelarut.

3.f.3. Uji Tantang / Challenge (hari ke 21)

Uji Tantang dilakukan 14 hari setelah induksi topikal terhadap seluruh kelompok uji, yang 24 jam sebelumnya dicukur di bagian punggung. Pemaparan sediaan uji tidak boleh pada tempat induksi topikal (tengkuk), sediaan uji dipaparkan secara topikal pada daerah C di punggung marmut yang telah dicukur, kemudian ditutup dengan *occlusive dressing* dan dibalut dengan *elastic bandage*. Hal yang sama dilakukan terhadap kontrol. Uji tantang perlu dilakukan pada kelompok kontrol untuk memastikan bahwa reaksi yang terjadi benar reaksi sensitisasi dan bukan reaksi iritasi. Setelah 24 jam, *occlusive dressing* dan *elastic bandage* dibuka, diamati dan dicatat adanya edema dan eritema pada jam ke 24, 48 dan 72.

3.g. Pengamatan

Reaksi kulit diuraikan dan kategorikan terhadap eritema dan uedema menurut skala *Magnusson* dan *Kligman* (Tabel 4). Catatan tambahan dapat dibuat jika ditemukan respon yang tidak biasa. Selain itu berat badan hewan uji sebelum dan setelah pengujian harus didata.

3.h. Evaluasi Hasil

Menurut *Magnusson* and *Kligman* bila hasil uji sensitisasi mempunyai skor ≥ 1 maka dikategorikan sebagai sediaan yang bersifat sensitisers. 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.

3.i. Reliabilitas Hasil

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

4. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan uji harus memuat informasi berikut:

1. Deskripsi dan cara pemaparan 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:
 - a. Identitas, konsentrasi (bila perlu), volume yang digunakan.
 - b. Alasan pemilihan zat pembawa.
3. Hewan Uji:
 - a. Spesies/jenis 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. Hasil Uji:
 - a. Deskripsi dari metode yang digunakan untuk membuat skor
 - b. Data respon iritan dibuat dalam bentuk tabel
 - c. Deskripsi dari derajat iritasi
5. Penilaian hasil
6. Pembahasan dan Kesimpulan.
7. Daftar Pustaka.

5. DAFTAR PUSTAKA

International Standard ISO 10993-10, 2002. Biological Evaluation of Medical Devices, Part 10 – Tests for Irritation and delayed-type hypersensitivity, Second Edition

Organization for Economic Cooperation and Development, 2001. OECD 406 Guidelines for Testing of Chemicals - Skin Sensitization

U.S. Environmental Protection Agency, 2003. Health Effects Test guidelines OPPTS 870.2600 – Skin Sensitization

F. IRITASI MATA

Uji iritasi mata adalah suatu uji pada hewan uji (kelinci albino) untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemaparan sediaan uji pada mata. Hasil uji dievaluasi berdasarkan kriteria bahaya dari *Globally Harmonised System (GHS) for The Classification of Chemical* (2009), seperti pada Tabel 6.

Tabel 6. Kriteria penggolongan sediaan uji yang bersifat korosif/iritan pada mata

Kategori	Kriteria
Kategori 1, efek irreversibel	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Terjadi efek buruk pada kornea, iris atau konjungtiva yang tidak sembuh selama periode pengamatan (21 hari) dan/atau ▪ Skor rata-rata pada pengamatan 24, 48, 72 jam terhadap 2 dari 3 ekor hewan uji : <ul style="list-style-type: none"> - Derajat opasitas kornea ≥ 3 dan/atau - Iritis $> 1,5$
Kategori 2 Efek reversibel	<p>Efek buruk pada kornea, iris atau konjungtiva sembuh selama periode pengamatan (21 hari) dan skor rata-rata pada pengamatan 24, 48, 72 jam terhadap 2 dari 3 ekor hewan uji:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 A / Iritan <ul style="list-style-type: none"> ▪ Derajat opasitas kornea ≥ 1 dan/atau ▪ Iritis ≥ 1 dan/atau ▪ Kemerahan konjungtiva ≥ 2 dan/atau ▪ Udem konjungtiva ≥ 2
▪ 2 B / iritan ringan	<p>Efek buruk pada kornea, iris atau konjungtiva sembuh selama periode pengamatan (7 hari) dan skor rata-rata pada pengamatan 24, 48, 72 jam terhadap 2 dari 3 ekor hewan uji:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Derajat opasitas kornea ≥ 1 dan/atau ▪ Iritis ≥ 1 dan/atau ▪ Kemerahan konjungtiva ≥ 2 dan/atau ▪ Udem konjungtiva ≥ 2

GHS, 2009

1. PRINSIP

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 pembunuhan hewan uji.

2. TUJUAN

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

Peringatan

Uji iritasi mata tidak perlu dilakukan dalam keadaan dimana :

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

3. PROSEDUR

3.a. Penyiapan Hewan Uji

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

3.b. Dosis dan Preparasi Sediaan Uji

3.b.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.b.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.b.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 vapisasi, 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 di akibatkan 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.b.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 7. Jika luas daerah sampel tidak dapat ditentukan, maka digunakan 100 mg elastomer atau 200 mg plastik atau bahan lain untuk setiap 20 ml cairan ekstraksi. Media ekstraksi yang dapat digunakan adalah natrium klorida 0,9 % dan atau minyak zaitun. Ekstraksi dilakukan dengan cara pemanasan dalam oven pada suhu 50°C selama 72 ± 2 jam atau dengan otoklaf pada suhu 121° C selama 60 menit. Kemudian ekstrak didekantasi dan disimpan pada suhu kamar, ekstrak digunakan maksimal 24 jam setelah ekstraksi. Terhadap kontrol dilakukan hal yang sama. Jumlah yang dipaparkan pada mata sama dengan jumlah sediaan uji berupa cairan yaitu 0,1 mL.

Tabel 7. Luas permukaan sampel yang digunakan

Bentuk bahan	Ketebalan	Jumlah sampel setiap 20 ml ekstraksi	untuk media menjadi	Dibagi menjadi
Film atau lembaran	< 0,5 mm	Setara dengan permukaan total (kedua sisi)	120 cm ²	Potongan $\pm 5 \times 0,3$ cm
	0,5 - 1 mm	Setara dengan permukaan total (kedua sisi)	60 cm ²	
Pipa/tabung	< 0,5 mm	Panjang (dalam cm) = 120 cm ² / (jumlah keliling diameter dalam dan diameter luar)		Potongan $\pm 5 \times 0,3$ cm
	0,5 - 1 mm	Panjang (dalam cm) = 60 cm ² / (jumlah keliling diameter dalam dan diameter luar)		

		diameter luar	
Lempeng, pipa/ tabung dan bahan cetakan	> 1 mm	Setara dengan luas permukaan total 60 cm ² (semua permukaan yang terpapar)	Potongan sampai ± 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.c. Cara Pemberian Sediaan Uji

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

3.d. 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 pemaparan 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.e. 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.f. Anestesi Lokal

Anestesi lokal dapat digunakan berdasarkan kasus per kasus. Jika berdasarkan fakta ada indikasi bahwa sediaan uji berpotensi menyebabkan sakit atau pada uji pendahuluan menunjukkan adanya reaksi yang menyakitkan, maka anestesi lokal dapat diberikan. 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 lidokain dengan cara meneteskan kedalam mata kelinci sebanyak 5-10 tetes.

3.g. 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.h. Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada jam ke-1, 24, 48 dan 72 setelah pemaparan 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* binokular, *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.i. Penilaian

Penilaian reaksi sediaan uji terhadap mata dinilai dan dicatat sesuai dengan skor pada Tabel 8. 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 8. Penilaian luka okular pada mata

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

5. DAFTAR PUSTAKA

Departemen Kesehatan, 1995. Farmakope Indonesia, Edisi IV.

International Standard ISO 10993-10, 2002. Biological Evaluation of Medical Devices, Part 10 – Tests for Irritation and delayed-type hypersensitivity, Second Edition.

Organization for Economic Cooperation and Development, 2001. OECD 405 Guidelines for Testing of Chemicals – Acute Eye Irritation/Corrosion

United Nations Economic Commission for Europe, 2009. Globally Harmonized System (GHS) of Classification and Labelling of Chemical, 3rd revised edition

U.S. Environmental Protection Agency, 2003. Health Effects Test guidelines OPPTS 870.2400 – Acute Eye Irritation

G. IRITASI AKUT DERMAL

Uji iritasi akut dermal adalah suatu uji pada hewan (kelinci albino) untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemaparan sediaan uji pada dermal selama 3 menit sampai 4 jam. Hasil uji dievaluasi berdasarkan kriteria bahaya dari *Globally Harmonised System (GHS) for The Classification of Chemical* (2009), seperti pada Tabel 9. Kriteria tersebut digunakan terutama untuk mengkategorikan sediaan uji yang berbahaya/ toksik. Bila sediaan uji sudah diketahui mempunyai pH ekstrim ($\text{pH} \leq 2$ atau $\geq 11,5$), maka sediaan tersebut tidak boleh diuji pada hewan uji.

Tabel 9. Kriteria penggolongan sediaan uji yang bersifat korosif/iritan pada kulit

Kategori	Kriteria
Kategori 1 Korosif	1A Respon korosif terjadi pada pemaparan selama ≤ 3 menit, pengamatan selama ≤ 1 jam pada ≥ 1 dari 3 ekor hewan uji
	1B Respon korosif terjadi pada pemaparan selama >3 menit sampai ≤ 1 jam, pengamatan selama ≤ 14 hari pada ≥ 1 dari 3 ekor hewan uji
	1C Respon korosif terjadi pada pemaparan selama >1 jam sampai ≤ 4 jam, pengamatan selama ≤ 14 hari pada ≥ 1 dari 3 ekor hewan uji
Kategori 2, Iritan	i. Skor rata-rata untuk eritema/udema $\geq 2,3$ sampai $\leq 4,0$ setelah pemaparan selama 4 jam, pengamatan selama 3 hari, pada minimal 2 dari 3 ekor hewan uji atau
	ii. Inflamasi tidak sembuh sampai hari ke 14 minimal pada 2 ekor hewan uji, terjadi alopecia pada daerah tertentu, <i>hyperplasia</i> , <i>scaling</i> atau
Kategori 3, Iritan ringan	ii. Terdapat efek eritema/udema yang jelas pada 1 ekor hewan uji walau tidak memenuhi kriteria diatas
Kategori 3, Iritan ringan	Skor rata-rata untuk eritema/udema $\geq 1,5$ sampai $\leq 2,3$ setelah pemaparan selama 4 jam, pengamatan selama 3 hari setelah terjadinya reaksi kulit tetapi tidak termasuk kategori seperti diatas, pada minimal 2 dari 3 ekor hewan uji

GHS, 2009

Selain pengkategorian seperti Tabel 8. 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 10). Nilai rata-rata dari kategori respon biasanya disebut sebagai Indeks Iritasi Primer.

Tabel 10. Kategori respon iritasi pada kelinci

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

ISO 10993-10, 2002

1. PRINSIP

Prinsip uji iritasi akut dermal adalah pemaparan sediaan uji dalam dosis tunggal kepada kulit hewan uji dengan area kulit yang tidak diberi perlakuan berfungsi sebagai kontrol. Derajat iritasi dinilai pada interval waktu tertentu yaitu pada jam ke 1, 24, 48 dan 72 setelah pemaparan 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.

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

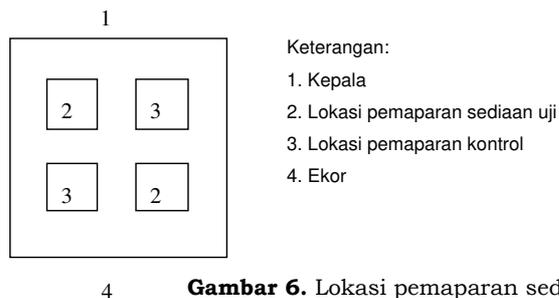
Hewan uji yang digunakan adalah kelinci albino jantan atau betina yang sehat dan dewasa, berat sekitar 2 kg. Sebelum pengujian dimulai, hewan uji diaklimatisasi di ruang percobaan kurang lebih selama 5 hari dan hewan ditempatkan pada kandang individual (1 kandang untuk 1 ekor). Sekurang-kurangnya 24 jam sebelum pengujian, bulu hewan harus dicukur pada daerah punggung seluas lebih kurang 10 x 15 cm atau tidak kurang 10% dari permukaan tubuh untuk tempat pemaparan sediaan uji. Pencukuran dimulai dari area tulang belikat (bahu) sampai tulang pangkal paha (tulang pinggang) dan setengah kebawah badan pada tiap sisi. Hewan yang digunakan untuk percobaan adalah hewan yang mempunyai kulit yang sehat.

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 sedangkan sediaan yang berupa wadah dan alat kesehatan dilakukan ekstraksi dan preparasi sediaan uji seperti yang tercantum pada Tabel 6. Dan dosis yang digunakan sebanyak 0,5 mL dari larutan hasil ekstraksi.

3.c. Cara Pemberian Sediaan Uji

Sediaan uji dipaparkan di area kulit seluas ± 6 (2 x 3) cm² dengan lokasi pemaparan seperti yang terlihat pada Gambar 6, kemudian lokasi pemaparan ditutup dengan kasa dan di plester dengan plester yang bersifat non-iritan. Jika pemberian secara langsung tidak memungkinkan (misalnya cairan atau pasta), sediaan uji harus dioleskan terlebih dahulu pada kasa 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.



Gambar 6. Lokasi pemaparan sediaan uji

3.d. Tahapan Uji

3.d.1. Bila sediaan uji diduga bersifat mengiritasi/ korosif

Uji dilakukan dengan menggunakan 1 hewan uji, dan menggunakan pendekatan sebagai berikut ini. Dibuat tiga tempelan (*patch*) untuk tiga pemaparan, tempelan ke-1 dibuka setelah 3 menit, jika tidak terlihat reaksi kulit yang serius maka tempelan ke-2 dibuka setelah 1 jam, jika pemaparan tidak mengakibatkan iritasi yang parah, maka tempelan ke-3 dibuka pada jam ke-4, dan ditentukan gradasi cedera kulit. Jika efek korosif tampak setelah 3 menit atau 1 jam, maka uji dihentikan dan semua tempelan dilepas. Pengamatan dilanjutkan selama 14 hari kecuali jika korosi terjadi pada awal pengujian. Tetapi jika tidak terlihat efek korosif setelah pemaparan selama 4 jam, maka pengujian dilanjutkan dengan menambah 2 hewan tambahan yang masing-masing dipaparkan selama 4 jam.

3.d.2. Bila sediaan uji diduga tidak bersifat mengiritasi/ korosif

Digunakan 3 hewan uji, masing-masing dibuat 1 tempelan dengan periode pemaparan selama 4 jam.

Residu sediaan uji segera dihilangkan menggunakan air atau pelarut lain setelah pemaparan 4 jam. Respon dari sediaan uji dinilai dengan berpedoman pada Tabel 11.

Tabel 11. Penilaian reaksi pada kulit

Pembentukan Eritema	Skor
Tidak ada eritema	0
Eritema yang sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan).....	1
Eritema terlihat jelas.....	2

Eritema sedang sampai parah.....	3
Eritema parah (merah daging) sampai pembentukan <i>eschar</i> yang menghambat penilaian eritema.....	4

Pembentukan Udema

Tidak ada udema	0
Udema sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan).....	1
Udema kecil (batas area terlihat jelas).....	2
Udema tingkat menengah (luasnya bertambah sekitar 1 mm)....	3
Udema parah (luas bertambah lebih dari 1 mm dan melebar melebihi area pemaparan oleh sediaan uji).....	4

OECD, 2002

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 udema, penilaian respon dilakukan pada jam ke 1, 24, 48, dan 72 setelah pembukaan tempelan (untuk sediaan uji yang tidak bersifat korosif/iritan). 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.

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.

3.g. Analisis Data

Hasil pengamatan dirangkum dalam bentuk tabel yang memperlihatkan keadaan secara individual, memuat skor iritasi untuk eritema dan edema 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. Skor iritasi (Indeks Iritasi Primer) sediaan uji adalah kombinasi dari seluruh observasi dari pengujian. Indeks Iritasi Primer dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan :

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

Klasifikasi iritasi kulit dapat dilihat pada Tabel. 8 dan Tabel. 9

3.i. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan uji harus memuat informasi berikut:

1. Dasar pemikiran untuk pengujian *invivo*: bukti analisa dari data pengujian sebelumnya, meliputi hasil dari strategi rangkaian pengujian:
 - a. Deskripsi data relevan yang tersedia dari pengujian sebelumnya.
 - b. Data yang diperoleh pada tiap langkah strategi pengujian.
2. Sediaan Uji:

- a. Identifikasi data (misal: sumber, kemurnian, nomer batch).
 - b. Sifat fisika alami dan sifat fisiokimia (misal: pH, volatilitas, kelarutan, stabilitas).
 - c. Apabila berupa campuran, komposisi dan persentase relatif dari komponen.
3. Zat pembawa:
- a. Identifikasi, konsentrasi (bila perlu), volume yang digunakan.
 - b. Alasan pemilihan zat pembawa.
4. Hewan Uji:
- a. Spesies/jenis hewan yang digunakan, alasan pokok untuk menggunakan jenis hewan lain selain kelinci albino.
 - b. Jumlah hewan tiap jenis kelamin
 - c. Umur tiap hewan pada permulaan pengujian.
 - d. Berat hewan pada awal dan akhir pengujian.
 - e. Sumber hewan, kondisi kandang, pakan, dan lain-lain.
5. Kondisi pengujian:
- a. Teknik persiapan area tempelan (pencukuran)
 - b. Rincian penggunaan bahan tempelan dan teknik pembuatan tempelan.
 - c. Rincian preparasi, penggunaan, dan penghapusan sediaan uji.
6. Hasil Uji:
- a. Skor eritema dan edema dibuat dalam bentuk tabel
 - b. Deskripsi dari luka akibat pemaparan 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.

4. DAFTAR PUSTAKA

International Standard ISO 10993-10, 2002. Biological Evaluation of Medical Devices, Part 10 – Tests for Irritation and delayed-type hypersensitivity, Second Edition.

Organization for Economic Cooperation and Development, 2002. OECD 404 Guidelines for Testing of Chemicals – Acute Dermal Irritation/Corrosion

United Nations Economic Commission for Europe, 2009. Globally Harmonized System (GHS) of Classification and Labelling of Chemical, 3rd revised edition

U.S. Environmental Protection Agency, 2003. Health Effects Test guidelines OPPTS 870.2500 – Acute Dermal Irritation.

H. IRTIASI 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 mempunyai pH ≤ 2 atau $\geq 11,5$ tidak perlu diuji, dan langsung dikategorikan sebagai bahan potensial yang bersifat iritasi terhadap vagina.

1. PRINSIP

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

2. TUJUAN

Uji ini digunakan untuk mengevaluasi keamanan dari alat-alat kesehatan yang kontak dengan mukosa vagina.

Peringatan

Uji iritasi mukosa vagina 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 $\geq 11,5$)
- b. Bahan uji telah terbukti bersifat korosif atau iritan kuat pada uji iritasi kulit
- c. Terdapat data dari studi lain yang relevan dan dapat dipercaya yang menunjukkan bahan uji akan menimbulkan iritasi serupa bila diuji pada 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 6. Jika luas daerah sampel tidak dapat ditentukan, maka digunakan 100 mg elastomer atau 200 mg plastik atau bahan lain untuk setiap 20 ml cairan ekstraksi. Media ekstraksi dapat menggunakan larutan NaCl fisiologis dan atau minyak zaitun. Ekstraksi dilakukan dengan cara pemanasan campuran bahan dan media dalam oven pada suhu 50°C selama 72 ± 2 jam atau dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 60 menit. Kemudian ekstrak didekantasi dan disimpan pada suhu kamar (30°C). Ekstrak digunakan maksimal 24 jam setelah ekstraksi. Terhadap kontrol dilakukan hal yang sama.

3.c. Cara Pemberian Sediaan Uji

Sejumlah 1 mL sediaan uji dipaparkan pada lapisan mukosa hewan uji menggunakan kateter atau spuit injeksi dengan sonde tumpul. Dilakukan 5 kali pemaparan berturut-turut dengan selang waktu 24 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 jam setelah pemaparan sediaan uji yang ke 1, 2, 3, 4 dan 5 diamati jaringan vaginal dengan cara membuka vagina dan perineum untuk melihat adanya eritema, eksudat dan edema. Bila ditemui adanya eritema, eksudat dan edema yang parah, maka hewan langsung dikorbankan dengan cara yang sesuai dengan prosedur pembunuhan hewan uji, serta diperiksa jaringan vaginal secara mikroskopis, maka pengujian dianggap selesai. Uji dihentikan saat ditemukan eritema atau edema yang parah meskipun waktu pengujian (5 hari) belum tercapai. Bila tidak ditemukan eritema, eksudat dan edema yang parah uji dapat dilanjutkan sampai hari ke 5. Kondisi hewan uji seperti kematian, tanda-tanda keracunan, perubahan perilaku diamati dan dicatat setiap hari sepanjang periode penelitian, berat badan sebelum dan sesudah pengujian dicatat.

3.e. Penilaian

Kelinci dikorbankan dengan cara diinjeksi pada dosis letal menggunakan sodium pentobarbital 24 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%, selanjutnya dibuat preparat histopatologi (Lampiran 23). ditambahkan gambar p Kemudian preparat histopatologi dievaluasi secara mikroskopik, dinilai pengaruh iritasi dengan menggunakan pedoman pada Tabel 12.

Tabel 12. Sistem klasifikasi mikroskopik terhadap reaksi jaringan vagina

Reaksi	Skor
Sel Epitel	
Normal, utuh	0
Degenerasi sel, <i>flattening</i>	1
Metaplasia	2
Erosi fokal	3
Erosi diseluruh permukaan	4
Infiltrasi leukosit (perbidang pandang)	

Tidak ada infiltrasi	0
Minimal, kurang dari 25	1
Ringan, 26 – 50	2
Sedang, 51 – 100	3
Berat, lebih dari 100	4
Kongesti vaskuler	
Tidak ada kongesti	0
Minimal	1
Ringan	2
Sedang	3
Tampak jelas, disertai kerusakan pembuluh darah	4
Udema	
Tidak ada udema	0
Minimal	1
Ringan	2
Sedang	3
Tampak jelas, disertai dengan kerusakan pembuluh darah.....	4

ISO 10993-10

3.f. Analisis Data

Indeks Iritasi dari hasil penilaian mikroskopis dihitung dan diklasifikasikan berdasarkan panduan ISO 10993-10 (Tabel 13).

Tabel 13. Indeks iritasi mukosa vagina

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

ISO 10993-10

Indeks iritasi dihitung dengan rumus berikut:

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

Keterangan

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

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

3.g. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan uji harus memuat informasi berikut:

1. Dasar pemikiran untuk pengujian *in vivo*: bukti analisis dari data pengujian sebelumnya, meliputi hasil dari strategi rangkaian pengujian:
 - a. Deskripsi data relevan yang tersedia dari pengujian sebelumnya.
 - b. Data yang diperoleh pada tiap langkah strategi pengujian.
2. Sediaan Uji:
 - a. Identifikasi data (misal: sumber, kemurnian, 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. 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 edema.
 - e. Deskripsi dari derajat iritasi korosi terhadap sel epitel, infiltrasi leukosit, kongesti vaskular, dan edema dari hasil histopatologi
6. Pembahasan dan Kesimpulan.

7. Daftar Pustaka.

4. DAFTAR PUSTAKA

Departemen Kesehatan, 1995. Farmakope Indonesia, Edisi IV.

International Standard ISO 10993-10, 2002. Biological Evaluation of Medical Devices, Part 10 – Tests for Irritation and delayed-type hypersensitivity, Second Edition.

I. TOKSISITAS AKUT DERMAL (*Fixed Dose Procedure*)

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

1. PRINSIP

Beberapa kelompok hewan uji dengan satu jenis kelamin dipapar dengan sediaan uji dengan dosis seperti pada (Lampiran 33 dan 34), dosis awal dipilih berdasarkan hasil uji pendahuluan (Lampiran 31 dan 32). Dipilih dosis yang memberikan gejala toksisitas tetapi yang tidak menyebabkan gejala toksik berat atau kematian. 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. Pengujian dilanjutkan sampai ditemukan dosis yang menyebabkan toksisitas yang nyata atau tidak lebih dari 1 ekor hewan yang mati, 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 pemaparan suatu zat melalui kulit secara akut dan untuk memperoleh informasi awal yang dapat digunakan untuk menetapkan tingkat dosis dan merancang uji toksisitas selanjutnya serta untuk menetapkan nilai LD₅₀ suatu zat, penentuan penggolongan zat, menetapkan informasi pada label dan informasi absorpsi pada kulit.

3. PROSEDUR

3.a. Hewan Uji dan Jumlah

Hewan yang digunakan adalah tikus putih, kelinci albino, marmut albino. Syarat hewan uji adalah dewasa muda, sehat. Berat badan untuk tikus putih adalah 200-300 g; kelinci albino 2,0-3,0 kg; dan marmut albino 350-450 g; dengan variasi berat badan tidak lebih dari 20% dari rata-rata bobot badan. Hewan yang digunakan hanya yang berkulit sehat. Masing-masing kelompok dosis menggunakan hewan tidak kurang dari 5 ekor dengan jenis kelamin yang sama. 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 kurang lebih selama 5 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 pemaparan 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.

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 pelarut (minyak nabati) yang sesuai sehingga dapat menempel pada kulit. Bila digunakan pelarut maka kemungkinan pengaruh pelarut berpenetrasi pada kulit perlu dipertimbangkan. 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 pemaparan 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 pemaparan ditutup dengan kasa berpori dan dibalut dengan perban elastis serta plester yang tidak mengiritasi selama 24 jam. Setelah selesai periode pemaparan, sisa bahan uji yang masih menempel pada kulit dihilangkan dengan air atau pelarut yang sesuai.

3.e. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan bertujuan untuk menetapkan dosis yang tepat untuk uji utama. Sediaan uji diberikan pada 1 ekor hewan uji untuk setiap dosis seperti yang tertera pada Lampiran 31 dan 32. Dosis awal dipilih dari tingkatan *fixed dose* yang diperkirakan dapat memberikan gejala toksisitas sedang yaitu 50, 200, 1000 dan 2000 mg/kg berat badan (BB). Bila memungkinkan data dari struktur kimia yang mirip dengan sediaan uji harus diperhatikan. Bila tidak terdapat data struktur kimia tersebut, maka dosis awal dimulai dari 1000 mg/kg BB. Seluruh hewan diamati selama 14 hari.

Dalam beberapa kasus, hewan yang diberi dosis terendah (50 mg/kg BB) terjadi kematian atau menunjukkan gejala toksisitas yang berat, maka pada kondisi

tersebut pengujian dihentikan dan sediaan uji dikategorikan dalam kategori 1 GHS. Namun hasil tersebut perlu dikonfirmasi dengan cara menambah 1 ekor hewan uji. Bila hewan ke-2 ini mati, maka uji tidak perlu dilanjutkan, tetapi bila hewan ke-2 hidup, maka uji dilanjutkan dengan 3 ekor hewan tambahan. Pada pengujian dengan tambahan 3 ekor hewan tersebut mempunyai indikasi kematian yang besar, maka hendaknya pengujian dilakukan 1 demi 1 ekor dengan interval waktu pemberian yang memungkinkan untuk melihat efek kematian dari hewan uji. Bila kematian ke-2 terjadi, maka uji dihentikan dan sediaan uji dikategorikan pada kategori 1 GHS. Jika hanya 1 ekor yang mati dari ke-5 hewan uji, maka dikategorikan pada kategori 2 GHS.

3.f. Uji Utama

Dosis awal pada uji utama (Lampiran 33 dan 34) diambil dari tingkat dosis dimana terjadi gejala toksik atau kematian pada uji pendahuluan. Secara umum terdapat 3 pilihan yang akan diambil:

- a. Bahan uji sudah dapat ditentukan pada dosis awal dan uji selanjutnya tidak diperlukan atau penghentian uji
- b. Melanjutkan uji dengan dosis yang lebih tinggi
- c. Melanjutkan uji dengan dosis yang lebih rendah.

Pengklasifikasian sediaan uji pada umumnya, sudah dapat ditentukan dari dosis awal. Pada setiap uji, diperlukan 5 ekor hewan uji untuk tiap tahapan dosis uji. Kelima ekor hewan tersebut terdiri dari 1 ekor hewan uji pendahuluan dan 4 ekor hewan tambahan (kecuali jika dosis dalam uji utama tidak diuji pada uji pendahuluan). Interval waktu antara pemberian dosis uji ditentukan oleh *onset*, lama dan beratnya toksisitas. Peralihan pemberian sediaan uji pada tahap dosis berikutnya, harus ditangguhkan 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.

Nilai LD₅₀ dapat dihitung apabila pada dosis seperti pada Lampiran 33-34 terjadi kematian. Pada kasus tersebut dosis awal ditentukan dari serangkaian dosis yang lebih rendah dan lebih tinggi dengan faktor perkalian tetap antara

1,2 sampai 1,6 hingga didapatkan kurva dosis respon. Sehubungan dengan *animal welfare*, bila akan menggunakan dosis diatas 5000 mg/kg atau pengujian untuk kategori 5 GHS, harus dipertimbangkan bahwa dosis tersebut sangat relevan dengan kepentingan untuk melindungi manusia, hewan dan atau lingkungan.

3.g. Pengamatan

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

3.h. Pengumpulan dan Analisis Data

3.h.1. Pengumpulan Data

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

3.h.2. Analisis Data

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

3.i. Interpretasi hasil

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

3.j. Pelaporan Hasil Pengujian

Laporan pengujian berisi informasi sebagai berikut:

1. Pendahuluan
2. Metode
 - a. Jenis hewan dan galur yang digunakan
 - b. Jenis kelamin hewan uji
 - c. Kondisi pemeliharaan hewan: ukuran kandang, jumlah hewan perkandang, bahan pembuat kandang (aluminium, fiber atau bahan lain)
 - d. Nama, bentuk sediaan uji
3. Hasil
 - a. Waktu terjadinya gejala-gejala toksik dan kematian
 - b. Data berat badan
 - c. Tabel yang berisi data respon dari beberapa tingkatan dosis (jumlah hewan yang mati atau dikorbankan selama waktu pengujian, jumlah hewan yang menunjukkan gejala toksisitas, jumlah hewan)

- d. Waktu pemberian zat uji dan waktu kematian setelah perlakuan
- e. Nilai LD_{50}
- f. Rentang angka kepercayaan LD_{50} sebesar 95%
- g. Kurva dan slop dosis-mortalitas
- h. Penemuan patologi (bila ada)
- i. Hasil dari uji yang lain dengan jenis kelamin berbeda

- 4. Pembahasan
- 5. Kesimpulan
- 6. Daftar Pustaka

4. DAFTAR PUSTAKA

Organization for Economic Cooperation and Development, 2004. OECD 434
Guidelines for Testing of Chemicals – Acute Dermal Toxicity.

United Nations Economic Commission for Europe, 2009. Globally Harmonized
System (GHS) of Classification and Labelling of Chemical, 3rd revised edition.

U.S. Environmental Protection Agency, 2003. Health Effects Test guidelines
OPPTS 870.1200 – Acute Dermal Toxicity.

J. TOKSISITAS SUBKRONIS DERMAL

2. PRINSIP

Sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari 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 diotopsi, organ dan jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup diotopsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ maupun jaringan, serta dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis, histopatologi.

3. TUJUAN

Untuk memperoleh informasi adanya:

- a. Efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut dermal.
- b. Efek toksik setelah pemaparan 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 pemaparan sediaan uji melalui kulit secara berulang dalam jangka waktu tertentu.

4. 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 apakah:

- a. dalam bentuk sekali pakai
- b. 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.

5. PROSEDUR

4.a. Hewan Uji dan Jumlah

4.a.1. Toksisitas Subkronis Dermal 28 Hari

Hewan yang digunakan adalah tikus putih, kelinci albino, marmut albino. Syarat hewan uji adalah sehat, berat badan untuk tikus putih 200-300 g, kelinci albino 2,0-3,0 kg, dan marmut albino 350-450 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 ad interim, jumlah hewan ditambahkan sesuai dengan jumlah yang akan dikorbankan. Selain itu pada kelompok dosis tinggi dibuat kelompok tambahan/satelit minimal 10 ekor hewan yang terdiri dari 5 jantan dan 5 betina. Pengamatan reversibilitas, persistensi, atau efek toksik tertunda pada kelompok satelit dilakukan selama 14 hari setelah pemberian sediaan uji.

4.a.2. Toksisitas Subkronis Dermal 90 hari

Hewan yang digunakan adalah tikus putih, kelinci albino, marmut albino. Syarat hewan uji adalah sehat, berat badan untuk tikus putih adalah 200-300 g, kelinci albino 2,0-3,0 kg, dan marmut albino 350-450 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.

Selain itu dibuat juga kelompok tambahan/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). 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 kurang lebih selama 5 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 pemaparan 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.

4.e. Penyiapan Sediaan uji

Untuk sediaan uji yang berupa cairan tidak perlu dilarutkan, sedangkan sediaan uji yang berbentuk padat harus dihaluskan dan dibasahi dengan air atau zat pembawa yang sesuai untuk memastikan adanya interaksi yang baik antara sediaan uji dengan kulit. Apabila menggunakan larutan pembawa harus dipertimbangkan bahwa zat tersebut tidak bersifat toksik atau tidak berpenetrasi ke dalam kulit.

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 pemaparan, 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 selama 7 hari atau minimal 5 hari dalam 1 minggu selama 28 hari.

b. Toksisitas Subkronis Dermal 90 Hari

Sediaan uji diberikan setiap hari selama 7 hari atau minimal 5 hari dalam 1 minggu selama 90 hari.

4.h. Pengamatan

Pengamatan terjadinya gejala-gejala toksik dan gejala klinis yang berupa perubahan kulit, bulu, mata, membran mukosa, sekresi, ekskresi, perubahan cara jalan, tingkah laku yang aneh (misalnya berjalan mundur), kejang,

memutilasi dirinya sendiri dilakukan setiap hari. 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 diotopsi. 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.

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 badandan Konsumsi Pakan

a. Hewan; berat badan hewan ditimbang

- Sesaat sebelum pemberian sediaan uji.
- Untuk kelompok satelit, setelah selesai periode pemberian sediaan uji, penimbangan dilakukan seminggu sekali.
- Pada saat terjadi kematian

b. Pakan; jumlah pakan ditimbang setiap minggu

4.k. Pengambilan Darah

Sebelum hewan diotopsi, hewan dipuasakan selama 16-18 jam. Darah diambil menggunakan alat suntik steril dan selalu dijaga agar tidak terkena air (untuk menghindari terjadinya hemolisa). Hewan dianestesi dengan eter dan selanjutnya darah diambil dari vena jugularis secara perlahan-lahan menggunakan alat suntik steril sebanyak 3-5 mL. Satu alat suntik digunakan untuk satu hewan. Sebanyak 0,5 mL darah dimasukkan kedalam tabung mikrosentrifus yang telah diisi antikoagulan (EDTA). Sebanyak 10 μ L untuk pemeriksaan hematologi. Sebanyak 0,5 mL darah diambil untuk pembuatan apusan darah menggunakan alat hematospiner untuk penetapan deferensial leukosit. Sisanya dimasukkan kedalam tabung pemusing/ tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) selama 10 menit, kemudian tabung dipindahkan ke dalam tangas es. Tabung dibiarkan dalam tangas es tidak kurang dari 20 menit dan segera disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan dalam lemari beku (-20°C) untuk pemeriksaan biokimia klinis.

4.l. Pemeriksaan Hematologi

Pemeriksaan hematologi yang harus dilakukan (Lampiran 5) meliputi: konsentrasi hemoglobin, jumlah eritrosit, jumlah leukosit, diferensial leukosit, hematokrit, jumlah platelet (trombosit), perhitungan tetapan darah yaitu: MCV, MCH, MCHC dan penetapan deferensial leukosit (Lampiran 6).

4.m. Pemeriksaan Biokimia Klinis

Pemeriksaan biokimia klinis yang harus dilakukan (Lampiran 7-22) menurut OECD (2001) meliputi: natrium, kalium, glukosa, total-kolesterol, trigliserida, nitrogen urea, kreatinin, total-protein, albumin, GOT, GPT, total-bilirubin, alkaline fosfatase, Gamma GT, LDH, asam empedu. Sedangkan menurut WHO (2000) pemeriksaan biokimia klinis meliputi : fungsi hati (GOT, GPT, Gamma GT)

dan fungsi ginjal (Nitrogen Urea, Kreatinin, Total-Bilirubin). Parameter utama minimum yang harus diperiksa adalah glukosa, total-kolesterol, trigliserida, nitrogen urea, kreatinin, GOT dan GPT

4.n. Pengamatan Makropatologi

Hewan yang telah dikorbankan harus segera diotopsi 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, hasil penimbangan disebut bobot absolut. Untuk analisa data bobot absolut dibagi berat badan yang lazim disebut bobot relatif.

4.p. Pemeriksaan Histopatologi

Organ yang diperiksa secara histopatologi meliputi: otak, pituitari, tiroid, timus, paru-paru, jantung, hati, ginjal, limpa, adrenal, pankreas, testis, vesikula seminalis, kantong kemih, indung telur, uterus, epididimis, usus, limfo nodus, saraf tepi, lambung, tulang dada, tulang paha, sumsum tulang belakang 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% dan dibuat preparat histopatologi (Lampiran 23) kemudian diperiksa menggunakan mikroskop.

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. Data berat badan dan makanan yang konsumsi
 - d. Hasil pemeriksaan hematologi
 - e. Hasil pemeriksaan biokimia klinis
 - f. Penemuan hasil pemeriksaan makropatologi dan histopatologi
 - g. Bobot organ absolut dan relatif
 - h. Analisa statistik antara lain menggunakan ANOVA
5. Pembahasan
6. Kesimpulan
7. Daftar Pustaka

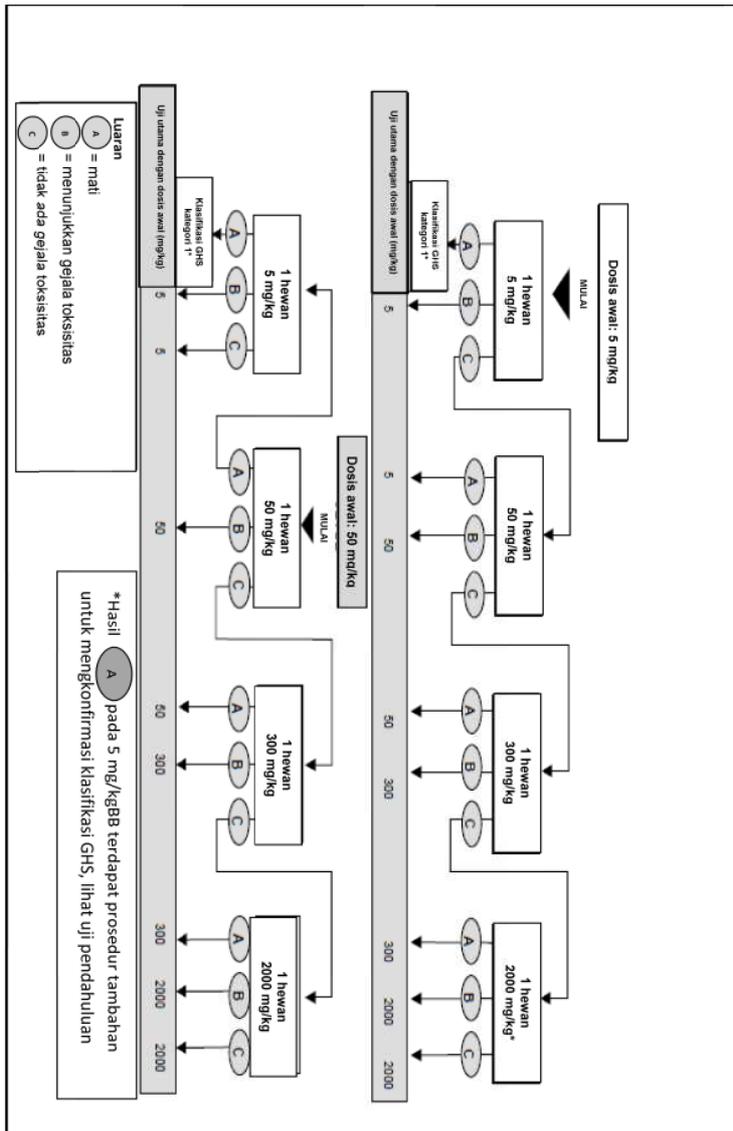
5. DAFTAR PUSTAKA

- Darelanko, Michael J, Hollinger, Mannfred A., 2002. Handbook of Toxicology 2nd edition. CRC Press.
- Organization for Economic Co-operation and Development, 2000. Subchronic Dermal Toxicity: 28-day study, OECD, 410.
- Organization for Economic Co-operation and Development, 2000. Subchronic Dermal Toxicity: 90-day study, OECD, 411.
- Redbook FDA, 2000. Chapter IV.C.9.b.: Guidelines for Developmental Toxicity Studies.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1998. Health Effects Test guidelines OPPTS 870.3200 – 21/28 - Day Dermal Toxicity, EPA.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1998. Health Effects Test guidelines OPPTS 870.3250 – 90 - Day Dermal Toxicity, EPA.

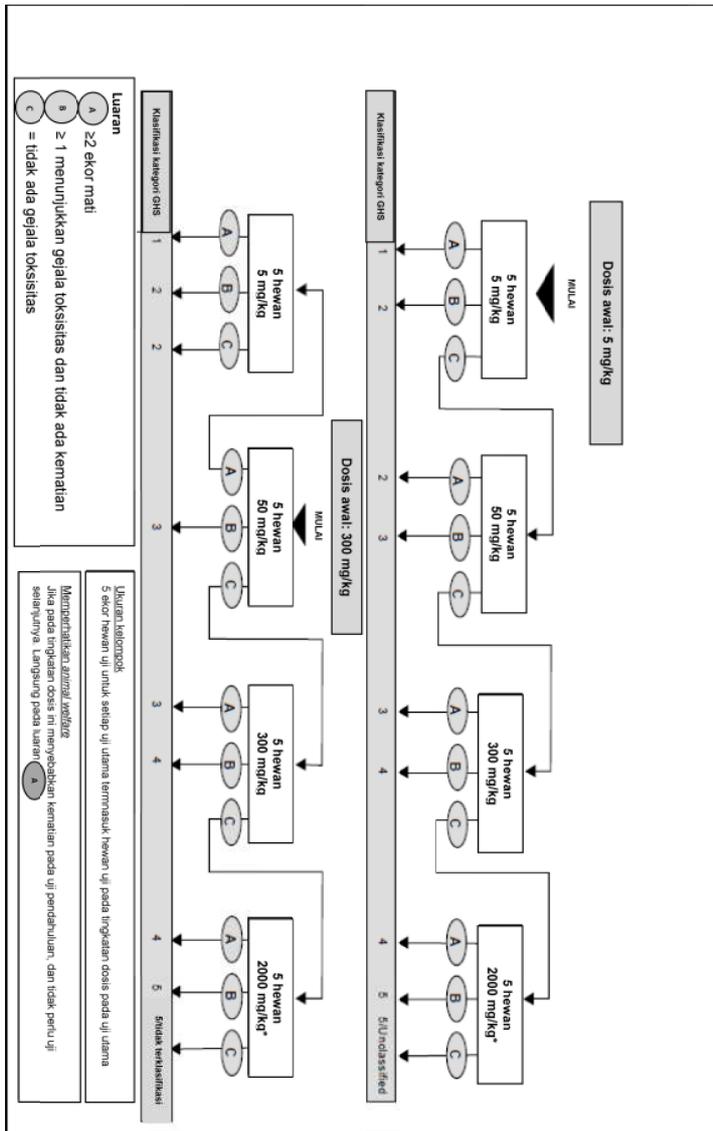
KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA,

ROY A. SPARRINGA

Lampiran 1. Bagan uji pendahuluan dengan *starting dose* 5 dan 50 mg/kg bobot badan (OECD, 2001)



Lampiran 3. Bagan uji utama dengan starting dose 5 dan 50 mg/kg bobot badan (OECD, 2001)



Lampiran 4. Bagan uji utama dengan starting dose 300 dan 2000 mg/kg bobot badan (OECD, 2001)

