

*Carva*

# MODUL PRAKTIKUM TOKSIKOLOGI

Tahun Akademik 2025/2026



PROGRAM STUDI FARMASI  
PROGRAM SARJANA

*Carva*

# **MODUL PRAKTIKUM**

## **TOKSIKOLOGI**



**Dosen Pengampu:**

apt. Wiwin Alfianna, M.Farm

**LABORATORIUM TOKSIKOLOGI**

**PROGRAM STUDI FARMASI**

**STIKES PRIMA INDONESIA**

**BEKASI**

**2026**

## **VISI DAN MISI PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI**

### **Visi:**

Mencetak sarjana farmasi yang berakhlak mulia dan unggul dalam pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi farmasi berbasis riset yang bermanfaat bagi masyarakat di Jawa Barat pada tahun 2030.

### **Misi:**

1. Menyelenggarakan program pendidikan sarjana farmasi yang bermutu dan berkualitas bagi seluruh lapisan masyarakat.
2. Mengembangkan penelitian bidang kefarmasian serta publikasi ilmiah pada skala nasional dan internasional.
3. Melaksanakan pengabdian kepada masyarakat dengan menerapkan hasil riset inovatif dan kompetitif tenaga pendidik.
4. Mengadakan kerjasama nasional dan internasional dalam riset dan pengembangan bidang kefarmasian untuk meningkatkan kompetensi tenaga pendidik dan lulusannya

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya, sehingga modul praktikum Toksikologi ini dapat disusun dan diselesaikan dengan baik.

Toksikologi merupakan cabang ilmu yang sangat penting dalam bidang farmasi yang mempelajari efek merugikan zat kimia, obat, maupun senyawa lain terhadap sistem biologis. Ilmu ini berperan besar dalam memahami hubungan antara dosis, paparan, mekanisme toksisitas, serta dampak zat beracun terhadap tubuh manusia dan lingkungan. Pemahaman toksikologi menjadi dasar penting dalam menjamin keamanan penggunaan obat dan bahan kimia, baik dalam aspek klinis maupun non-klinis.

Modul praktikum ini disusun sebagai penuntun bagi mahasiswa untuk meningkatkan pemahaman konseptual sekaligus keterampilan praktis di bidang toksikologi. Materi praktikum disajikan secara sistematis dan sederhana agar mudah dipahami, serta dilengkapi dengan prosedur kerja yang jelas guna membantu mahasiswa dalam melaksanakan praktikum dan melakukan pengamatan terhadap efek toksik pada hewan uji atau model percobaan yang digunakan.

Penulis menyadari bahwa modul praktikum ini masih memiliki keterbatasan dan kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat diharapkan sebagai bahan evaluasi dan penyempurnaan modul praktikum Toksikologi ini di masa mendatang.

Bekasi, Februari 2026

Penulis

## **TATA TERTIB DAN PELAKSANAAN PRAKTIKUM**

1. Praktikan wajib menggunakan Jas Laboratorium lengkap dengan logo STIKes Prima Indonesia
2. Praktikan wajib menyediakan alat dan bahan minimal sehari sebelum Praktikum dimulai
3. Praktikan wajib menjaga kebersihan laboratorium baik sebelum maupun sesudah penggunaan laboratorium
4. Praktikan wajib menggunakan pakaian yang rapi dan sopan serta menggunakan alas kaki sesuai yang ditetapkan oleh Laboratorium
5. Praktikan wajib menggunakan masker
6. Praktikan pria diwajibkan berambut rapi dan untuk praktikan wanita diharapkan untuk mengikat rambutnya jika tidak menggunakan hijab
7. Praktikan dilarang makan dan minum di dalam laboratorium
8. Praktikan dilarang melakukan komunikasi selain terkait praktikum yang sedang dijalankan
9. Apabila alat laboratorium rusak atas kelalaian praktikan, maka praktikan wajib melakukan ganti rugi terhadap peralatan yang rusak
10. Praktikan dilarang mengambil gambar menggunakan handphone selain untuk kepentingan dokumentasi laboratorium
11. Praktikan dilarang keluar masuk pada saat praktikum kecuali atas dasar arahan dosen atau asisten laboratorium
12. Praktikan dilarang melakukan kegiatan-kegiatan lain diluar arahan Dosen atau asisten laboratorium
13. Apabila praktikan melakukan pelanggaran tata tertib maka praktikan akan diberikan teguran berupa teguran lisan
14. Apabila praktikan melakukan pelanggaran tata tertib setelah mendapat teguran lisan maka praktikum dilarang mengikuti praktikum untuk hari tersebut
15. Apabila praktikan melakukan pelanggaran tata tertib selama tiga kali berturut-turut maka dosen berhak tidak meluluskan praktikan.

## DAFTAR ISI

<b>VISI DAN MISI PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI.....</b>	<b>2</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>3</b>
<b>TATA TERTIB DAN PELAKSANAAN PRAKTIKUM.....</b>	<b>4</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>5</b>
<b>BAB I KETENTUAN UMUM UJI TOKSISITAS PRAKLINIK SECARA IN VIVO.....</b>	<b>6</b>
PRAKTIKUM I.....	7
PRAKTIKUM II.....	14
<b>BAB II UJI TOKSISITAS PRAKLINIK SECARA IN VIVO.....</b>	<b>33</b>
PRAKTIKUM III.....	33
PRAKTIKUM IV.....	35
PRAKTIKUM V.....	37
PRAKTIKUM VI.....	39
PRAKTIKUM VII.....	41
<b>BAB III Uji Toksisitas Akut Oral dengan Metode OECD 425 (<i>Up-and-Down Procedure</i>).....</b>	<b>43</b>
PRAKTIKUM IX-XIII.....	43
<b>BAB IV UJI TOKSISITAS AKUT ORAL MENGGUNAKAN METODE <i>BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT)</i>.....</b>	<b>54</b>
PRAKTIKUM XIV & XV.....	54

**BAB I**  
**KETENTUAN UMUM UJI TOKSISITAS PRAKLINIK**  
**SECARA IN VIVO**

Uji Toksisitas Praklinik secara In Vivo yang selanjutnya disebut Uji Toksisitas adalah uji yang dilakukan pada hewan uji untuk mendeteksi efek toksik pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis respon yang khas dari sediaan uji. Uji Toksisitas ini dilaksanakan sebagai bagian dari tahapan pengembangan sediaan obat atau bahan uji lainnya sebelum dilakukan pengujian pada manusia, dengan tujuan untuk menjamin keamanan penggunaan serta mengidentifikasi potensi risiko yang mungkin timbul. Pelaksanaan uji dilakukan dengan memperhatikan prinsip ilmiah yang berlaku, etika penggunaan hewan uji, serta kaidah kesejahteraan hewan (animal welfare). Hasil uji toksisitas digunakan sebagai dasar dalam penentuan dosis aman, identifikasi organ target toksisitas, serta evaluasi hubungan antara dosis dan respon yang ditimbulkan.

Pedoman Uji Toksisitas sebagaimana dimaksud pada ayat (1) meliputi:

- a. ketentuan umum pada Uji Toksisitas;
- b. Uji Toksisitas meliputi:
  1. uji toksisitas akut oral;
  2. uji toksisitas subkronis oral;
  3. uji toksisitas kronis oral;
  4. uji teratogenesis;
  5. uji sensitisasi kulit;
  6. uji iritasi mata;
  7. uji iritasi/korosi akut dermal;
  8. uji iritasi mukosa vagina;
  9. uji toksisitas akut dermal;
  10. uji toksisitas subkronis dermal; dan
  11. uji karsinogenesis.

## **PRAKTIKUM I**

### **A. Persetujuan komisi etik**

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

### **B. Sediaan uji**

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

#### **1. Sediaan uji yang berupa zat kimia memerlukan informasi berikut:**

- a. Identitas bahan
- b. Sifat fisiko-kimia
- c. Kemurnian
- d. Kadar cemaran

#### **2. Sediaan uji yang berupa simplisia dan/atau ekstrak tanaman obat memerlukan informasi berikut:**

- a. Nama latin dan nama daerah tanaman
- b. Deskripsi daerah penanaman (jika tersedia)
- c. Bagian tanaman yang digunakan
- d. Pemerian
- e. Cara pembuatan dan penanganan
- f. Kandungan kimia
- g. Riwayat empiris

### **C. Penerapan cara berlaboratorium hewan uji yang baik**

Uji Toksisitas Praktikum secara In Vivo dilaksanakan di laboratorium hewan uji. Laboratorium hewan uji menerapkan cara berlaboratorium hewan uji yang baik yang dapat mengacu pada The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals yang terkini atau pada Peraturan Menteri Pertanian Nomor 44/Permentan/OT.140/5/2007 Tahun 2007 tentang Pedoman Berlaboratorium Veteriner yang Baik (Good Veterinary Laboratory Practice). Berdasarkan peraturan Menteri Pertanian Nomor 44/Permentan/OT.140/5/2007 Tahun 2007, sarana fisik dan lingkungan laboratorium hewan uji yang diperlukan adalah sebagai berikut:

#### **1. Bangunan dan sarana fisik:**

- a. Bersifat permanen, kuat dan mudah dalam pemeliharaannya;
- b. Memiliki fasilitas sumber air yang memadai;
- c. Memiliki sumber energi listrik dan cahaya yang memadai/cukup untuk menerangi ruangan;
- d. Memiliki ruang yang cukup luas untuk ruang gerak petugas dan alat-alat;
- e. Memiliki sistem ventilasi yang baik;
- f. Memiliki dinding kedap air, tidak korosif, mudah dibersihkan dan didesinfeksi;
- g. Memiliki sistem pengatur suhu ruang;
- h. Memiliki langit-langit yang tidak mudah mengelupas dan memiliki bentuk yang lengkung/tidak membentuk sudut pada pertemuan antara dinding dengan lantai dan dinding dengan dinding sehingga tidak terjadi akumulasi kotoran;
- i. Memiliki lantai yang rata, halus, kuat, tidak licin, tidak mudah pecah,

- kedap air, terbuat dari bahan yang tahan terhadap zat-zat kimia dan api, mudah dibersihkan dan didesinfeksi;
- j. Memiliki pintu, jendela dan kusen terbuat dari bahan bukan kayu, tidak korosif, kedap air, tidak toksik dan tahan hama;
  - k. Tersedia fasilitas meja laboratorium yang tahan terhadap bahan kimia, air, rayap dan tidak korosif;
  - l. Tersedia ruangan yang terpisah dengan baik untuk pengujian yang berbeda dan tidak saling mempengaruhi;
  - m. Tersedia fasilitas pengendalian akses ke luar masuk ruangan laboratorium tertentu;
  - n. Tersedia fasilitas untuk melakukan kegiatan pengujian yang menggunakan hewan uji.

## **2. Peralatan**

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

- a. Disesuaikan dengan ruang lingkup pemeriksaan dan pengujian;
- b. Ketelusuran (traceability) dan dikalibrasi secara berkala;
- c. Dirawat dan ditempatkan pada tempat yang sesuai dengan fungsinya;
- d. Dilengkapi dengan petunjuk penggunaan alat dan buku catatan pemakaian;
- e. Mempunyai penanggung jawab sesuai jenis dan fungsi peralatannya;
- f. Dioperasikan oleh petugas yang memiliki kompetensi sesuai bidangnya;
- g. Dibersihkan dan dikembalikan pada tempatnya sesuai dengan kondisi semula;
- h. Prosedur perawatan dan pemakaian harus didokumentasikan;
- i. Mempunyai rekaman untuk setiap jenis peralatan yang mencakup

spesifikasi dan informasi dari produsen mengenai pembuat alat, nama peralatan, nama pabrik, identitas jenis dan nomor seri, letaknya pada saat ini, kondisi saat diterima, dan petunjuk penggunaan alat;

j. Mencantumkan tanggal hasil kalibrasi, jadwal rencana perawatan yang akan dilakukan serta riwayat terjadinya kerusakan dan atau perbaikan peralatan yang telah dilakukan.

### **3. Lingkungan**

Lingkungan laboratorium harus memenuhi persyaratan sebagai berikut:

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

### **D. Penyiapan sediaan uji**

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

#### **1. Formulasi dalam media cair**

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

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

dilarutkan pada cairan pembawa.

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

## **2. Campuran pada makanan**

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

## **E. Volume pemberian sediaan uji secara oral**

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

maksimal yang dapat diberikan adalah 1 mL.

#### **F. Dosis uji**

Umumnya dosis uji harus mencakup dosis yang setara dengan dosis penggunaan yang lazim pada manusia. Dosis lain meliputi dosis dengan faktor perkalian tetap yang mencakup dosis yang setara dengan dosis penggunaan lazim pada manusia sampai mencapai dosis yang dipersyaratkan untuk tujuan pengujian atau sampai batas dosis tertinggi yang masih dapat diberikan pada hewan uji sesuai kemampuan lambung hewan uji yang digunakan. Namun, pada uji toksisitas akut, sehubungan dengan tujuan utama uji toksisitas akut adalah mencari LD50 sehingga dosis awal yang digunakan memang yang menimbulkan efek toksik ringan berdasarkan informasi awal atau apabila tidak tersedia informasi menggunakan dosis sesuai yang direkomendasikan.

#### **G. Kelompok kontrol**

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

#### **H. Cara pemberian sediaan uji**

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

#### **I. Refrensi**

Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. (2022). *Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 10 Tahun 2022 tentang Pedoman Uji Toksisitas Praklinik Secara In Vivo*. Badan POM RI.

## **J. Quiz**

Kerjakan quiz berikut ini!

1. Sebutkan pengertian uji toksisitas praklinik secara in vivo berdasarkan pedoman yang berlaku
2. Tuliskan minimal lima jenis uji toksisitas yang termasuk dalam pedoman uji toksisitas praklinik
3. Jelaskan tujuan dilaksanakannya uji toksisitas sebelum pengujian pada manusia
4. Uraikan fungsi persetujuan komisi etik dalam penelitian menggunakan hewan uji
5. Sebutkan informasi yang harus tersedia pada sediaan uji berupa zat kimia murni
6. Jelaskan perbedaan informasi yang diperlukan pada sediaan uji simplisia dibandingkan zat kimia murni
7. Uraikan persyaratan sarana fisik laboratorium hewan uji yang baik
8. Jelaskan prinsip penyiapan sediaan uji dalam bentuk cair dan berikan contoh bahan pembawa yang dapat digunakan
9. Uraikan ketentuan volume maksimal pemberian sediaan uji secara oral pada rodensia
10. Jelaskan peran kelompok kontrol dalam menjaga validitas hasil uji toksisitas

## PRAKTIKUM II

### A. 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 dai 20%. Adapun kriteria umur hewan uji dapat menyesuaikan dengan kebutuhan pengujian toksisitas yang akan dilakukan.

**Tabel 1.** Kriteria hewan uji yang digunakan dalam uji toksisitas

No.	Jenis Hewan	Bobot minimal	Rentang umur
1	Mencit	20 g	6-8 minggu
2	Tikus	120 g	6-8 minggu
3	Marmut	250 g	4-5 minggu
4	Kelinci	1800 g	8-9 minggu

Untuk uji toksisitas kronik oral, umur hewan uji disesuaikan dengan penjabaran pada uji toksisitas kronik oral pada Bab III.

### B. Kondisi ruangan dan pemeliharaan hewan uji

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

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

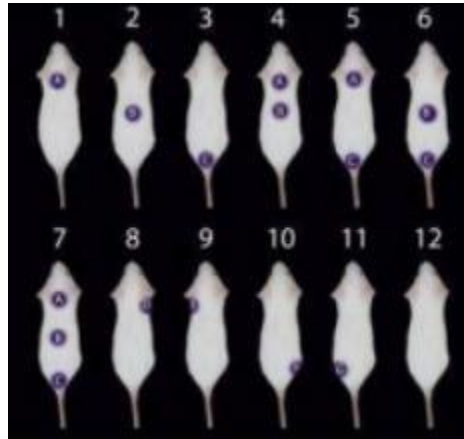
**Tabel 2.** Luas area kandang per ekor hewan uji

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

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

### C. Randomisasi dan cara penandaan hewan uji

Hewan uji dilakukan randomisasi dengan secara acak dimasukkan ke dalam setiap kelompok sesuai dengan pengelompokan hewan uji. Setelah pengacakan, tidak ada perbedaan yang signifikan dalam rata-rata berat badan antar kelompok. Setiap hewan harus diberi nomor identifikasi unik, dan diberi tanda secara permanen. Penandaan hewan uji dapat dilakukan dengan cara memberikan penanda yang sesuai (misalnya penanda yang tidak toksik atau *food grade*) atau larutan asam pikrat 10% dalam alkohol. Walaupun demikian penggunaan larutan asam pikrat sebaiknya dihindari karena berisiko meledak dan membahayakan personil maupun fasilitas. Penandaan dilakukan dengan tujuan membedakan antara hewan satu dengan yang lainnya. Penandaan biasanya dilakukan seperti pada gambar 1 dan Tabel 3.



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

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

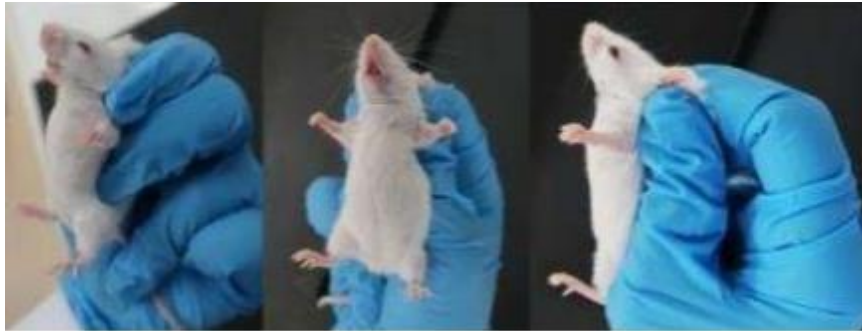
**Tabel 3.** Tempat penandaan hewan uji

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

#### **D. Cara memegang (*handling*) hewan uji**

Cara memegang hewan uji jenis rodensia berbeda antara tikus dan mencit pada saat pemberian sediaan uji secara oral. Pemegangan yang benar sangat diperlukan sewaktu pemberian sediaan uji, karena pemegangan yang salah dapat berakibat fatal. Cara pemegangan yang salah dapat menyebabkan antara lain: sediaan uji yang diberikan tidak dapat masuk kedalam lambung tetapi masuk kedalam paru-paru, sehingga mengakibatkan kematian hewan uji. Disisi lain, pemegangan yang

salah juga dapat mengakibatkan terjadinya kecelakaan kerja seperti tergigit oleh hewan. Cara pemegangan hewan yang benar dapat dilihat pada Gambar 2, 3 dan 4.



**Gambar 2.** Cara memegang mencit pada pemberian sediaan uji secara oral

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



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

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



**Gambar 4.** Cara memegang kelinci

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

## E. Pengambilan dan penanganan darah hewan uji

### 1. Pengambilan Darah Hewan Uji

Pengambilan darah menggunakan alat suntik steril atau alat yang sesuai yang steril dan selalu dijaga agar tidak terjadi hemolisis. Pada umumnya pengambilan darah yang terlalu banyak pada hewan kecil akan menyebabkan syok hipovolemik, stres, dan bahkan dapat menyebabkan kematian. Pengambilan darah yang tidak sesuai aturan juga dapat menyebabkan anemia pada hewan pengujian. Pada umumnya pengambilan darah hanya dilakukan sekitar 10% dari total volume darah pada tubuh hewan uji dalam selang waktu 2-4 minggu (total volume darah adalah 79 mL/kg berat badan pada mencit dan 64 mL/kg berat badan pada tikus). Atau sekitar 1% dari berat tubuh dengan interval 24 jam. Batas maksimal koleksi darah yang tidak meresikokan keselamatan hewan (one time sampling) adalah 7.7 mL/kg berat badan untuk mencit dan 5.5 mL/kg berat badan untuk tikus. Pengambilan darah dapat dilakukan melalui:

#### a. Ekor

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



**Gambar 5.** Pengambilan darah tikus di ekor

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

## b. Mata

Hewan sebelumnya dianestesi, lokasi pengambilan darah pada sinus retro-orbitalis mata dengan menggunakan pipet Pasteur atau tabung hematokrit. Aplikasi dapat dilakukan dengan menusukkan pipet dengan sudut kemiringan  $45^\circ$ . Sampel dapat diperoleh dari kedua mata secara bergantian (Gambar 6). Metode ini dapat menghasilkan volume darah dalam jumlah besar, namun dapat mengakibatkan trauma pada mata dan kebutaan (terutama pada tikus) sehingga harus dilakukan oleh personil yang kompeten. Koleksi darah melalui perlukaan retro-orbital lebih umum dilakukan pada mencit dan tidak disaankan pada hewan tikus karena memerlukan beberapa syarat khusus.

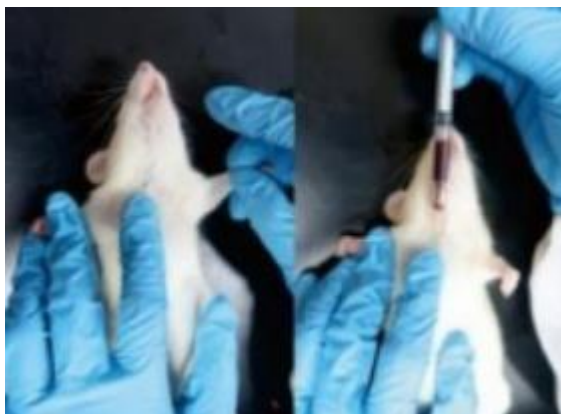


**Gambar 6.** Pengambilan darah mencit di mata

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

## c. Vena jugularis

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

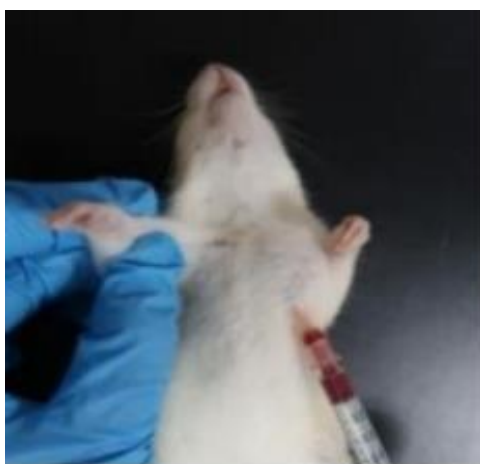


**Gambar 7.** Pengambilan darah tikus di vena jugularis

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

#### d. Intrakardium

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



**Gambar 8.** Pengambilan darah tikus di intrakardium

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

e. Vena saphena

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



**Gambar 9.** Pengambilan darah tikus di vena saphena

(Villano and Sharp 2012)

f. Vena submandibularis

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



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

## 2. Penanganan Darah Hewan Uji

Untuk memperoleh serum, darah total (whole blood) dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit, kemudian dipindahkan ke dalam es tidak lebih dari 20 menit dan segera disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya serum dipisahkan dan disimpan segera dalam lemari beku ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) untuk assay. Jika diinginkan plasma, maka darah total (whole blood) diberikan Garam Etilen Diamin Tetra Asetat ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{K}_2\text{EDTA}$  atau  $\text{K}_3\text{EDTA}$ ) atau natrium sitrat atau heparin (antikoagulan). Garam EDTA paling banyak digunakan karena jarang berinterferensi dengan assay yang dilakukan. Umumnya digunakan kadar garam EDTA sebesar 1,5 mg/mL atau 5 mM pada konsentrasi akhir.

### **F. Rentang nilai kontrol rata-rata parameter biokimia klinis dan hematologi pada hewan uji**

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

#### a. Parameter biokimia klinis

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

<b>Parameter (satuan)</b>	<b>Umur 1-3 Bulan</b>	<b>Umur 6-12 Bulan</b>
Albumin (d/dl)	1,6 – 2,6	1,3 – 2,6

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

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

Parameter (satuan)	Umur	Umur	Umur	Umur
	10-12	18-20	32-34	58-60
	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu
ALT (IU/l)	10-40	10-50	10-50	20-60
Albumin (g/dl)	3,4-4,1 (M)	3,3-4,2 (M)	3,5-4,0 (M)	3,0-3,8 (M)
	3,5-4,5 (F)	3,5-4,7 (F)	4,0-5,0 (F)	3,5-4,5 (F)
Alkalin fosfatase (IU/l)	140-300 (M)	50-150 (M)	50-150 (M)	50-150 (M)
	80-100 (F)	25-150 (F)	25-100 (F)	25-100 (F)
AST (IU/l)	45-90	45-100	45-120	60-120
Asam empedu ( μ mol/l)	20-60	20-6	-	-
Total bilirubin (mg/dl)	0,2-0,4	0,1-0,5	0,1-0,5	0,1-0,5
Kalsium (mg/dl)	9,8-12,0	9,8-12,0	9,8-12,0	9,8-12,0
Klorida (mEq/l)	97-105	97--105	97-105	97-105

Kolesterol total (mg/dl)	50-85	50-100	70-140	60-150
Creatinin (mg/dl)	0,3-0,8	0,3-0,9	0,3-1,0	0,4-0,8
Gamma-Gt (IU/l)	0-2	0-2	0-3	0-5
Glukosa (mg/dl)	90-175	100-175	100-200	100-200
LDH (IU/l)	50-400	50-400	50-500	-
Fosfor anorganik (mg/dl)	7,0-10,0	4,0-8,5	4,0-8,0	3,5-7,0
Kalium (mEq/l)	5,5-8,0	4,0-7,0	4,0-7,0	4,0-7,0
Total protein (g/dl)	6,2-7,6 (M)	6,2-7,8 (M)	6,2-8,0 (M)	6,0-8,0 (M)
	6,3-8,3 (F)	6,5-8,5 (F)	7,0-9,0 (F)	6,5-8,5 (F)
Natrium (mEq/l)	140-153	140-153	140-153	140-153
Sorbitol dehydrogenase (IU/l)	10-30	10-30	10-30	-
Trigliserida (mg/dl)	50-125	50-200	50-200	20-300
BUN (mg/dl)	12-18	12-20	12-20	12-18

**Tabel 6. Tikus**

(Villano and Sharp, 2012)

<b>Parameter (satuan)</b>	<b>Rentang Nilai</b>
ALT (IU/l)	52-224
Albumin (g/dl)	2,9-5,9
Alkalin fosfatase (IU/l)	-
AST (IU/l)	-
Asam empedu ( $\mu$ mol/l)	0,0-0,64

Total bilirubin (mg/dl)	9,1-15,1
Kalsium (mg/dl)	84-110
Klorida (mEq/l)	-
Kolesterol total (mg/dl)	-
Creatinin (mg/dl)	0,4-1,4
Glukosa (mg/dl)	80-300
LDH (IU/l)	-
Fosfor anorganik (mg/dl)	4,7-16
Kalium (mEq/l)	3,6-9,2
Total protein (g/dl)	4,5-8,4
Natrium (meq/l)	142-154
Trigliserida (mg/dl)	50-125
BUN (mg/dl)	11-23

**Tabel 7. Tikus UCFM Sprague-Dawley**

(Delwatta SL, Gunatilake M, Baumans V, et al, 2018)

Parameter (satuan)	Rentang Nilai	
	Jantan	Betina
ALT (IU/l)	1-223,3	2,1 426,9
AST (IU/l)	0,2-838,3	20,8-470,2
Asam empedu ( $\mu$ mol/l)	-	-
Total bilirubin (mg/dl)	-	-

Kolesterol total (mg/dl)	14,4-81,7	20,4-87,6
Creatinin (mg/dl)	0,2-1,2	0,2-1,2
Glukosa (mg/dl)	62,4-201,8	56,1-197,2
HDL (mg/dl)	9,7-42,1	0,2-63,3
Total protein (g/dl)	-	-
Trigliserida(mg/dl)	2,7-47,8	8,7-60,7
BUN (mg/dl)	17,26-45,12	12,33-77,6

b. Parameter hematologi

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

<b>Parameter (satuan)</b>	<b>Umur 1-3 Bulan</b>	<b>Umur 6-12 Bulan</b>
Jumlah eritrosit ( $10^6/\text{mm}^3$ )	8,5-10,5	8,8-10,6
Hematokrit (%)	42,5-47,9	38,3-46,9
Hemoglobin (g/dl)	14,5-16,8	14,2-17,0
Jumlah leukosit ( $10^3/\text{mm}^3$ )	2,0-5,7	2,0-5,0
MCH (pg)	15,8-18,4	15,1-17,5
MCHC (g/dl)	34,2-38,1	35,1-40,6
MCV (fl)	46,3-50,3	40,9-45,9
Jumlah platelet ( $10^3/\text{mm}^3$ )	-	-

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

<b>Parameter (satuan)</b>	<b>Umur 10-12 Minggu</b>	<b>Umur 18-20 Minggu</b>	<b>Umur 32-34 Minggu</b>	<b>Umur 58-60 Minggu</b>
Jumlah eritrosit ( $10^6/\text{mm}^3$ )	6,8-8,5 (M)	7,0-9,8 (M)	7,0-9,6 (M)	7,0-9,2 (M)
	7,0-8,2 (F)	6,5-9,2 (F)	6,5-8,8 (F)	6,5-8,5 (F)
Hematokrit (%)	40,0-48,0	36,0-52,0	36,0-50,0	38,0-48,0
Hemoglobin (g/dl)	14,0-17,0	14,0-17,0	14,0-17,0	14,0-17,0
Jumlah leukosit ( $10^3/\text{mm}^3$ )	6,0-18,0 (M)	6,0-19,0 (M)	6,0-18,0 (M)	5,0-15,0 (M)
	4,0-14,0 (F)	5,0-14,0 (F)	4,0-11,0 (F)	3,0-9,0 (F)
MCH (pg)	19,0-22,0	16,0-20,0	17,0-21,0	16,0-21,0
MCHC (g/dl)	33,0-38,0	31,0-38,0	31,0-38,0	32,0-38,0
MCV (fl)	53,0-63,0	50,0-60,0	4,0-60,0	46,0-58,0
Methemoglobin (% Hb)	0,4-1,2	0,4-1,2	0,4-1,2	-
Jumlah platelet ( $10^3/\text{mm}^3$ )	900-1300	800-1200	700-1200	700-1200
PT (s)	9,0-14,0	9,0-14,0	10,0-14,0	10,0-14,0

**Tabel 10. Tikus**  
(Villano and Sharp, 2012)

<b>Parameter (satuan)</b>	<b>Rentang Nilai</b>
Jumlah eritrosit ( $10^6/\text{mm}^3$ )	5-10
Hematokrit (%)	35-57
Hemoglobin (g/dl)	11-19
Jumlah leukosit ( $10^3/\text{mm}^3$ )	3-17
MCH (pg)	18-23

MCHC (g/dl)	31-40
MCV (fl)	46-65
Methemoglobin (% Hb)	-
Jumlah platelet ( $10^3/\text{mm}^3$ )	200-1500
PT (s)	15,7-25,4

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

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

Catatan: -, data tidak tersedia

M, Jantan

F, Betina

## **G. Cara mengorbankan hewan uji**

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

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

### **1. Prinsip Eutanasia**

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

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

- a. Cara dislokasi leher untuk hewan kecil seperti mencit dan tikus dengan berat badan kurang dari 200 gram.
- b. Cara anestesi secara inhalasi dengan obat bius halogenated (seperti halotan, isofluran, sevofluran) atau CO<sub>2</sub> (menggunakan chamber khusus). Penggunaan eter untuk anestesi dan eutanasia sudah tidak direkomendasikan.

c. Cara anestesi dengan metode penyuntikan. Metode dengan penyuntikan obat bius dapat dilakukan menggunakan dosis yang disarankan untuk eutanasia (dosis letal) misalnya dengan ketamine dan xylazine, urethane atau pentobarbital.

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

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

## **H. Pemusnahan hewan uji**

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

### **1. Rendering**

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

### **2. Insinerasi (pembakaran)**

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

### 3. Penguburan

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

#### **I. Analisis data**

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

#### **J. 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.

#### **K. Refrensi**

Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. (2022). *Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 10 Tahun 2022 tentang Pedoman Uji Toksisitas Praktikum Secara In Vivo*. Badan POM RI.

#### **L. Quiz**

Kerjakan quiz berikut ini!

1. Sebutkan jenis hewan yang paling sering digunakan dalam uji toksisitas
2. Tuliskan kriteria umur dan bobot mencit serta tikus yang digunakan dalam pengujian

3. Uraikan standar suhu dan kelembaban ruangan pemeliharaan hewan uji
4. Jelaskan tujuan aklimatisasi hewan uji sebelum perlakuan
5. Uraikan prinsip randomisasi dalam pembagian kelompok hewan uji
6. Sebutkan beberapa metode penandaan hewan uji
7. Jelaskan risiko kesalahan dalam teknik memegang hewan uji saat pemberian sediaan oral
8. Tuliskan batas maksimal pengambilan darah pada mencit dan tikus dalam satu kali pengambilan
9. Uraikan prinsip humane endpoint dalam uji toksisitas
10. Jelaskan perbedaan metode insinerasi dan penguburan dalam pemusnahan hewan uji

## **BAB II**

### **UJI TOKSISITAS PRAKLINIK SECARA IN VIVO**

#### **PRAKTIKUM III**

#### **Uji Toksisitas Akut Oral dan Uji Toksisitas Subkronis Oral**

##### **A. Tujuan Praktikum**

Mahasiswa mampu memahami prinsip, metode, dan parameter uji toksisitas akut oral dan subkronis oral berdasarkan hasil penelitian yang dilaporkan dalam jurnal ilmiah.

##### **B. Dasar Teori**

Uji toksisitas akut oral merupakan pengujian praklinik yang bertujuan untuk mengetahui efek toksik yang muncul setelah pemberian senyawa uji melalui rute oral dalam satu kali dosis atau beberapa dosis dalam waktu singkat. Pengujian ini digunakan untuk mengidentifikasi gejala toksisitas awal, menentukan kisaran dosis toksik, serta memperkirakan nilai LD<sub>50</sub>. Parameter yang diamati meliputi mortalitas, perubahan perilaku, serta tanda klinis toksisitas pada hewan uji.

Uji toksisitas subkronis oral dilakukan untuk menilai efek toksik akibat pemberian senyawa uji secara berulang dalam jangka waktu menengah, umumnya selama 28 hingga 90 hari. Uji ini bertujuan untuk mengidentifikasi organ target toksisitas, hubungan dosis-respon, serta perubahan fisiologis dan biokimia yang mungkin tidak terdeteksi pada uji akut. Data dari uji subkronis sangat penting dalam penentuan NOAEL dan LOAEL sebagai dasar evaluasi keamanan senyawa.

##### **C. Objek dan Metode Kajian**

Objek kajian berupa jurnal ilmiah yang memuat uji toksisitas akut oral dan subkronis oral secara *in vivo*. Metode kajian dilakukan dengan mereview desain penelitian, hewan uji, dosis, rute pemberian, serta parameter pengamatan yang dilaporkan dalam jurnal.

#### **D. Parameter yang Dikaji**

- a) Mortalitas dan tanda klinis toksisitas
- b) Perubahan berat badan
- c) Parameter hematologi dan biokimia
- d) Gambaran histopatologi organ target

#### **E. Analisis dan Pembahasan**

Analisis dilakukan terhadap hasil uji toksisitas yang dilaporkan dalam jurnal, mencakup tingkat toksisitas, hubungan dosis–respon, serta kesesuaian metode dengan pedoman uji toksisitas.

#### **F. Kesimpulan**

Kesimpulan ditarik berdasarkan hasil review jurnal terkait keamanan dan potensi toksik senyawa uji.

## **PRAKTIKUM IV**

### **Uji Toksisitas Kronis Oral dan Uji Teratogenisitas**

#### **A. Tujuan Praktikum**

Mahasiswa mampu menganalisis efek toksik jangka panjang dan potensi teratogenik suatu senyawa berdasarkan jurnal ilmiah.

#### **B. Dasar Teori**

Uji toksisitas kronis oral bertujuan untuk mengevaluasi efek toksik akibat paparan senyawa uji dalam jangka waktu panjang, biasanya lebih dari enam bulan. Pengujian ini penting untuk mengidentifikasi efek kumulatif, perubahan patologis jangka panjang, serta potensi kerusakan organ yang mungkin terjadi akibat penggunaan senyawa secara terus-menerus. Parameter yang diamati mencakup perubahan berat badan, konsumsi pakan, parameter hematologi, biokimia, serta gambaran histopatologi organ.

Uji teratogenisitas merupakan pengujian toksisitas reproduksi yang bertujuan untuk menilai potensi suatu senyawa dalam menyebabkan kelainan perkembangan embrio atau janin. Uji ini dilakukan dengan memberikan senyawa uji pada hewan bunting selama periode organogenesis. Evaluasi teratogenisitas meliputi pengamatan terhadap mortalitas janin, keterlambatan pertumbuhan, serta adanya kelainan struktural atau fungsional pada janin, yang sangat penting dalam penilaian keamanan penggunaan senyawa pada wanita hamil.

#### **C. Objek dan Metode Kajian**

Objek kajian berupa jurnal ilmiah uji toksisitas kronis oral dan teratogenisitas. Metode kajian dilakukan melalui penelaahan desain penelitian, durasi paparan, serta parameter perkembangan dan toksisitas.

#### **D. Parameter yang Dikaji**

- a) Perubahan berat badan dan konsumsi pakan
- b) Kelainan perkembangan embrio/janin
- c) Mortalitas dan abnormalitas morfologi
- d) Gambaran histopatologi

#### **E. Analisis dan Pembahasan**

Pembahasan difokuskan pada hubungan antara paparan jangka panjang dan efek toksik yang timbul serta implikasinya terhadap keamanan penggunaan.

#### **F. Kesimpulan**

Kesimpulan mencerminkan tingkat keamanan senyawa terhadap penggunaan jangka panjang dan risiko teratogenik.

## **PRAKTIKUM V**

### **Uji Sensitisasi Kulit dan Uji Iritasi Mata**

#### **A. Tujuan Praktikum**

Mahasiswa mampu memahami metode dan interpretasi uji sensitisasi kulit dan iritasi mata berdasarkan jurnal ilmiah.

#### **B. Dasar Teori**

Uji sensitisasi kulit bertujuan untuk menilai kemampuan suatu senyawa dalam menimbulkan reaksi alergi setelah paparan berulang pada kulit. Reaksi sensitisasi terjadi akibat respon imun yang dimediasi oleh sel T setelah fase induksi dan elisitasi. Pengujian ini penting untuk menilai keamanan senyawa yang diaplikasikan secara topikal, terutama pada produk farmasi, kosmetik, dan bahan kimia industri.

Uji iritasi mata dilakukan untuk mengevaluasi potensi suatu senyawa dalam menyebabkan iritasi atau kerusakan pada jaringan mata. Pengujian ini mengamati perubahan pada kornea, iris, dan konjungtiva setelah paparan senyawa uji. Tingkat iritasi dinilai berdasarkan derajat kemerahan, edema, dan reversibilitas efek, yang menjadi dasar dalam penentuan tingkat bahaya dan keamanan penggunaan suatu sediaan.

#### **C. Objek dan Metode Kajian**

Objek kajian berupa jurnal ilmiah uji sensitisasi kulit dan iritasi mata secara *in vivo*. Metode kajian dilakukan dengan mereview metode uji dan sistem penilaian reaksi iritasi atau sensitisasi.

#### **D. Parameter yang Dikaji**

- a) Derajat kemerahan dan edema
- b) Skor reaksi iritasi
- c) Reversibilitas efek

d) Gambaran histopatologi (jika ada)

### **E. Analisis dan Pembahasan**

Analisis difokuskan pada tingkat iritasi atau sensitisasi serta relevansinya terhadap keamanan sediaan topikal.

### **F. Kesimpulan**

Kesimpulan ditarik berdasarkan potensi iritasi dan sensitisasi senyawa uji.

## **PRAKTIKUM VI**

### **Uji Iritasi/Korosi Akut Dermal dan Uji Iritasi Mukosa Vagina**

#### **A. Tujuan Praktikum**

Mahasiswa mampu menganalisis potensi iritasi atau korosi lokal berdasarkan hasil uji toksisitas yang dilaporkan dalam jurnal.

#### **B. Dasar Teori**

Uji iritasi atau korosi akut dermal bertujuan untuk menilai kemampuan suatu senyawa dalam menyebabkan kerusakan lokal pada kulit setelah paparan tunggal atau berulang dalam waktu singkat. Iritasi ditandai dengan peradangan reversibel, sedangkan korosi menyebabkan kerusakan jaringan yang bersifat ireversibel. Uji ini penting dalam evaluasi keamanan bahan yang diaplikasikan langsung pada kulit.

Uji iritasi mukosa vagina dilakukan untuk menilai keamanan sediaan yang diaplikasikan pada jaringan mukosa. Mukosa memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan kulit, sehingga pengujian ini diperlukan untuk mengidentifikasi potensi iritasi, peradangan, atau kerusakan jaringan. Hasil uji ini menjadi dasar dalam penilaian keamanan sediaan vaginal sebelum digunakan pada manusia.

#### **C. Objek dan Metode Kajian**

Objek kajian berupa jurnal ilmiah uji iritasi dermal dan mukosa vagina. Metode kajian dilakukan melalui review metode uji, durasi paparan, dan parameter lokal yang diamati.

#### **D. Parameter yang Dikaji**

- a) Kemerahan, edema, dan nekrosis
- b) Skor iritasi atau korosi
- c) Reversibilitas efek

d) Gambaran histopatologi

### **E. Analisis dan Pembahasan**

Pembahasan difokuskan pada tingkat kerusakan jaringan dan implikasi keamanan penggunaan lokal.

### **F. Kesimpulan**

Kesimpulan mencerminkan tingkat iritasi atau korosi senyawa uji.

## **PRAKTIKUM VII**

### **Uji Toksisitas Akut Dermal, Uji Toksisitas Subkronis Dermal, dan Uji Karsinogenesis**

#### **A. Tujuan Praktikum**

Mahasiswa mampu mengevaluasi efek toksik melalui rute dermal dan potensi karsinogenik berdasarkan jurnal ilmiah.

#### **B. Dasar Teori**

Uji toksisitas dermal bertujuan untuk mengevaluasi efek toksik suatu senyawa yang masuk ke dalam tubuh melalui kulit. Uji toksisitas akut dermal menilai efek toksik setelah paparan tunggal, sedangkan uji toksisitas subkronis dermal dilakukan untuk mengetahui efek akibat paparan berulang dalam jangka waktu tertentu. Parameter yang diamati meliputi tanda klinis toksisitas, perubahan berat badan, serta efek sistemik maupun lokal.

Uji karsinogenesis merupakan pengujian toksisitas jangka panjang yang bertujuan untuk mengidentifikasi potensi suatu senyawa dalam menyebabkan kanker. Uji ini dilakukan melalui paparan kronis dan evaluasi pembentukan tumor, perubahan histopatologi, serta proliferasi sel abnormal. Data karsinogenesis sangat penting dalam penilaian risiko dan keamanan senyawa untuk penggunaan jangka panjang.

#### **C. Objek dan Metode Kajian**

Objek kajian berupa jurnal ilmiah uji toksisitas dermal dan karsinogenesis. Metode kajian dilakukan dengan mereview desain penelitian dan parameter toksikologi.

#### **D. Parameter yang Dikaji**

- a) Mortalitas dan tanda klinis toksisitas
- b) Perubahan berat badan

- c) Gambaran histopatologi
- d) Pembentukan tumor

#### **E. Analisis dan Pembahasan**

Analisis difokuskan pada hubungan paparan dermal dengan efek toksik serta potensi karsinogenik senyawa uji.

#### **F. Kesimpulan**

Kesimpulan ditarik berdasarkan tingkat keamanan dan risiko karsinogenisitas senyawa.

**BAB III**  
**Uji Toksisitas Akut Oral dengan Metode OECD 425**  
**(*Up-and-Down Procedure*)**

**PRAKTIKUM IX-XIII**

**A. Pendahuluan**

Uji toksisitas akut oral adalah pengujian yang dilakukan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji secara oral, biasanya dalam dosis tunggal atau dosis berulang dalam waktu 24 jam, pada hewan uji seperti mencit atau tikus. Tujuan utama uji ini adalah untuk menentukan potensi toksisitas akut suatu zat, biasanya dinyatakan sebagai LD<sub>50</sub>, yaitu dosis yang menyebabkan kematian pada 50% hewan uji. Selain itu, uji ini juga bertujuan mengamati gejala klinis toksisitas, organ target, serta spektrum dan mekanisme efek toksik yang ditimbulkan. Hewan uji diamati secara intensif selama 14 hari setelah perlakuan untuk mencatat gejala toksik, kematian, dan perubahan fisiologis lainnya. Hewan yang dikorbankan karena sekarat (menunjukkan indikasi rasa nyeri, sakit, dan distres) dihitung sebagai hewan mati yang berkaitan dengan pemberian sediaan zat uji.

Metode OECD 425, atau *Up-and-Down Procedure*, adalah metode uji toksisitas akut oral yang bertujuan memperkirakan nilai LD<sub>50</sub> (dosis letal median) suatu zat dengan menggunakan jumlah hewan uji yang lebih sedikit dibandingkan metode konvensional. Pada prosedur ini, hewan uji (biasanya tikus atau mencit) diberikan dosis secara bertahap satu per satu, dengan interval minimal 24–48 jam antar hewan. Dosis berikutnya ditentukan berdasarkan respons hewan sebelumnya: jika hewan bertahan, dosis dinaikkan; jika hewan mati, dosis diturunkan dengan faktor tertentu (umumnya 3,2x), atau bisa menggunakan aplikasi AOT425StatPgm. Pengamatan dilakukan selama 14 hari untuk mencatat gejala toksik dan kematian. Metode ini mengutamakan efisiensi penggunaan hewan dan tetap memberikan estimasi LD<sub>50</sub> yang akurat sesuai standar internasional.

Uji batas (limit test) terutama digunakan dalam situasi di mana peneliti memiliki informasi yang menunjukkan bahwa bahan uji kemungkinan tidak bersifat toksik, yaitu memiliki tingkat toksisitas di bawah dosis batas yang ditetapkan oleh regulasi. Informasi mengenai toksisitas bahan uji dapat diperoleh dari pengetahuan tentang senyawa serupa yang telah diuji, campuran serupa yang telah diuji, atau produk yang sejenis, dengan mempertimbangkan identitas dan persentase komponen yang diketahui memiliki signifikansi toksikologis. Dalam situasi di mana hanya terdapat sedikit atau tidak ada informasi mengenai toksisitasnya, atau ketika bahan uji diperkirakan bersifat toksik, maka uji utama harus dilakukan.

### **Uji batas (limit test pada 2000 mg/kg)**

Berikan dosis pada satu hewan uji dengan dosis uji (2000 mg/kg). Jika hewan tersebut mati, lakukan uji utama untuk menentukan nilai LD<sub>50</sub>. Jika hewan tersebut bertahan hidup, berikan dosis secara berurutan kepada empat hewan tambahan sehingga total lima hewan diuji. Namun, jika tiga hewan mati, uji batas dihentikan dan uji utama dilakukan. Nilai LD<sub>50</sub> dinyatakan lebih besar dari 2000 mg/kg apabila tiga atau lebih hewan bertahan hidup. Jika seekor hewan mati secara tidak terduga pada tahap akhir penelitian dan masih terdapat hewan lain yang hidup, maka pemberian dosis dihentikan dan semua hewan diamati untuk melihat apakah hewan lain juga akan mati dalam periode observasi yang serupa (lihat paragraf 31 untuk periode observasi awal). Kematian yang terjadi terlambat tetap dihitung sama seperti kematian lainnya. Hasil dievaluasi sebagai berikut (O = hidup/survive, X = mati/death).

LD<sub>50</sub> dinyatakan lebih kecil dari dosis uji (2000 mg/kg) apabila tiga atau lebih hewan mati.

Contoh pola hasil:
O XO XX
O OX XX

O XX OX

O XX X

Jika hewan ketiga mati, lakukan uji utama. Uji lima hewan. LD<sub>50</sub> dinyatakan lebih besar dari dosis uji (2000 mg/kg) apabila tiga atau lebih hewan bertahan hidup.

Contoh pola hasil:

O OO OO

O OO XO

O OO OX

O OO XX

O XO XO

O XO OO/

O OX XO

O OX OO/X

O XX OO

#### **Uji Batas pada 5000 mg/kg**

Dalam keadaan luar biasa, dan hanya jika dibenarkan oleh kebutuhan regulasi tertentu, penggunaan dosis 5000 mg/kg dapat dipertimbangkan (lihat Lampiran 4). Namun, demi pertimbangan kesejahteraan hewan, pengujian pada rentang Kategori 5 GHS (2000–5000 mg/kg) tidak dianjurkan dan hanya boleh dilakukan apabila terdapat kemungkinan kuat bahwa hasil uji tersebut memiliki relevansi langsung untuk melindungi kesehatan manusia, hewan, atau lingkungan. Berikan dosis pada satu hewan uji dengan dosis uji (5000 mg/kg). Jika hewan tersebut mati, lakukan uji utama untuk menentukan nilai LD<sub>50</sub>. Jika hewan

tersebut bertahan hidup, berikan dosis pada dua hewan tambahan. Jika kedua hewan tersebut bertahan hidup, maka LD<sub>50</sub> dinyatakan lebih besar dari dosis batas dan pengujian dihentikan (yaitu tetap dilakukan observasi penuh selama 14 hari tanpa pemberian dosis tambahan pada hewan lain).

Jika satu atau kedua hewan tersebut mati, maka berikan dosis pada dua hewan tambahan, satu per satu. Apabila seekor hewan mati secara tidak terduga pada tahap akhir penelitian dan masih terdapat hewan lain yang hidup, maka pemberian dosis dihentikan dan semua hewan diamati untuk melihat apakah hewan lain juga akan mati dalam periode observasi yang serupa (lihat paragraf 10 untuk periode observasi awal).

Kematian yang terjadi terlambat tetap dihitung sama seperti kematian lainnya. Hasil dievaluasi sebagai berikut:

O = hidup (survival)
X = mati (death)
U = tidak perlu/Unnecessary

Nilai LD<sub>50</sub> dinyatakan lebih kecil dari dosis uji (5000 mg/kg) apabila tiga atau lebih hewan mati.

Contoh pola hasil:
O XO XX
O OX XX
O XX OX
O XX X

Nilai LD<sub>50</sub> dinyatakan lebih besar dari dosis uji (5000 mg/kg) apabila tiga atau lebih hewan bertahan hidup.

Contoh pola hasil:
O OO
O XO XO
O XO O
O OX XO
O OX O
O XX OO

### Uji Utama (Main Test)

Hewan uji diberikan dosis secara berurutan, biasanya dengan interval 48 jam. Namun, interval waktu antar pemberian dosis ditentukan berdasarkan waktu munculnya, durasi, dan tingkat keparahan tanda-tanda toksik. Pemberian dosis pada hewan berikutnya harus ditunda sampai terdapat keyakinan bahwa hewan yang telah diberi dosis sebelumnya akan bertahan hidup. Interval waktu dapat disesuaikan apabila diperlukan, misalnya pada respons yang tidak meyakinkan. Uji lebih mudah dilaksanakan apabila digunakan satu interval waktu tetap untuk pengambilan keputusan dosis berurutan. Namun demikian, tidak perlu menghitung ulang dosis atau likelihood-ratio apabila interval waktu berubah di tengah pengujian. Dalam memilih dosis awal, semua informasi yang tersedia harus digunakan, termasuk data mengenai zat yang memiliki struktur serupa dan hasil uji toksisitas lain terhadap bahan uji, untuk memperkirakan nilai  $LD_{50}$  serta kemiringan (slope) kurva dosis-respons.

Hewan pertama diberikan dosis satu tingkat di bawah perkiraan awal terbaik dari  $LD_{50}$ .

- a) Jika hewan bertahan hidup, hewan kedua diberi dosis yang lebih tinggi.
- b) Jika hewan pertama mati atau tampak sekarat (moribund), hewan kedua diberi dosis yang lebih rendah.

Faktor progresi dosis dipilih sebagai antilog dari  $1/(\text{perkiraan slope kurva dosis-respons})$  dan harus tetap konstan selama pengujian (progresi 3,2 setara dengan slope 2). Apabila tidak tersedia informasi mengenai slope zat yang diuji, maka digunakan faktor progresi dosis sebesar 3,2. Dengan faktor progresi default tersebut, dosis dipilih dari urutan berikut: 1,75 – 5,5 – 17,5 – 55 – 175 – 550 – 2000 mg/kg (atau 1,75 – 5,5 – 17,5 – 55 – 175 – 550 – 1750 – 5000 mg/kg untuk kebutuhan regulasi tertentu).

Jika tidak tersedia perkiraan mengenai tingkat letalitas zat, maka pemberian dosis dimulai pada 175 mg/kg. Pada sebagian besar kasus, dosis ini bersifat subletal sehingga membantu mengurangi rasa sakit dan penderitaan hewan uji. Jika toleransi hewan terhadap bahan kimia diperkirakan sangat bervariasi (yaitu slope  $< 2,0$ ), maka dapat dipertimbangkan untuk meningkatkan faktor progresi dosis di atas nilai default 0,5 pada skala log dosis (yaitu faktor 3,2) sebelum uji dimulai. Sebaliknya, untuk zat dengan slope sangat curam, faktor progresi dosis yang lebih kecil dari default sebaiknya digunakan. (Lampiran 2 memuat tabel progresi dosis untuk slope bilangan bulat 1–8 dengan dosis awal 175 mg/kg).

Pemberian dosis dilanjutkan berdasarkan hasil pada interval waktu tetap (misalnya 48 jam) dari semua hewan yang telah diuji hingga saat tersebut. Pengujian dihentikan apabila salah satu dari kriteria penghentian berikut pertama kali terpenuhi:

- a) Tiga hewan berturut-turut bertahan hidup pada batas atas dosis;
- b) Terjadi lima kali pembalikan respons (reversal) dalam enam hewan berturut-turut yang diuji;
- c) Setidaknya empat hewan telah mengikuti reversal pertama dan nilai likelihood-ratio yang ditentukan melebihi nilai kritis (lihat paragraf 44 dan Lampiran 3. Perhitungan dilakukan setiap kali pemberian dosis, dimulai dari hewan keempat setelah reversal pertama).

Untuk berbagai kombinasi nilai  $LD_{50}$  dan slope, kriteria (c) biasanya terpenuhi dengan 4–6 hewan setelah terjadi reversal. Dalam beberapa kasus,

khususnya untuk zat dengan kurva dosis-respons yang landai (shallow slope), mungkin diperlukan hewan tambahan (hingga total maksimum 15 hewan). Setelah kriteria penghentian tercapai, estimasi LD<sub>50</sub> dihitung berdasarkan hasil akhir hewan uji menggunakan metode yang dijelaskan pada paragraf 40 dan 41.

Hewan yang tampak sekarat (moribund) dan kemudian dieliminasi demi alasan kemanusiaan diperlakukan sama seperti hewan yang mati selama uji. Jika seekor hewan mati secara tidak terduga pada tahap akhir penelitian dan masih terdapat hewan lain yang hidup pada dosis tersebut atau dosis yang lebih tinggi, maka pemberian dosis dihentikan dan semua hewan diamati untuk melihat apakah hewan lain juga akan mati dalam periode observasi yang serupa. Jika hewan yang bertahan kemudian juga mati dan tampak bahwa semua tingkat dosis melebihi LD<sub>50</sub>, maka sebaiknya penelitian diulang kembali dengan memulai setidaknya dua tingkat dosis di bawah dosis terendah yang menyebabkan kematian (serta memperpanjang periode observasi), karena metode ini paling akurat apabila dosis awal berada di bawah LD<sub>50</sub>.

Namun, jika hewan selanjutnya tetap bertahan hidup pada atau di atas dosis hewan yang mati, maka tidak perlu mengubah progresi dosis karena data kematian tersebut tetap akan dimasukkan dalam perhitungan sebagai kematian pada dosis yang lebih rendah dibandingkan hewan yang bertahan, sehingga akan menurunkan estimasi LD<sub>50</sub>.

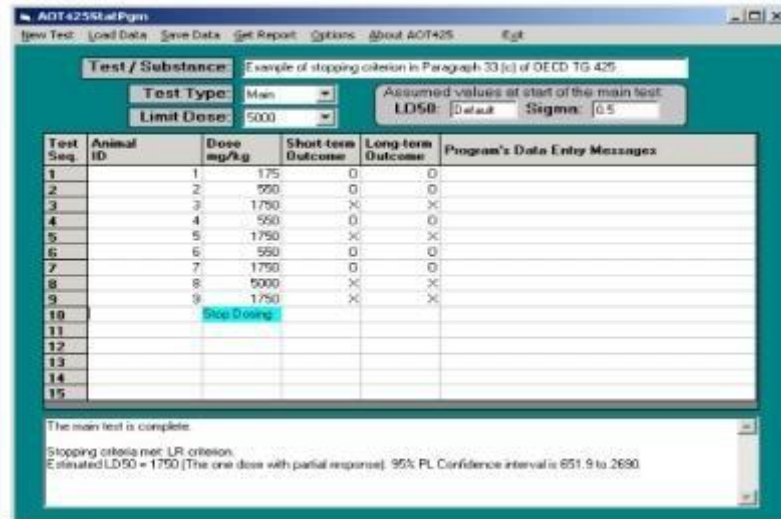
Hewan uji diamati secara individual setidaknya satu kali selama 30 menit pertama setelah pemberian dosis, kemudian secara berkala selama 24 jam pertama dengan perhatian khusus pada empat jam pertama, dan selanjutnya diamati setiap hari selama total 14 hari, kecuali apabila hewan harus dikeluarkan dari penelitian dan dieliminasi secara manusiawi demi kesejahteraan hewan atau ditemukan mati. Namun demikian, durasi observasi tidak boleh ditetapkan secara kaku. Lama pengamatan harus disesuaikan dengan reaksi toksik yang muncul, waktu timbulnya gejala, serta durasi masa pemulihan, dan dapat diperpanjang apabila dianggap perlu. Waktu muncul dan hilangnya tanda-tanda toksisitas sangat penting untuk dicatat, terutama apabila terdapat kecenderungan timbulnya gejala

yang bersifat tertunda. Seluruh hasil pengamatan harus dicatat secara sistematis dengan pencatatan individual untuk setiap hewan uji.

Apabila hewan terus menunjukkan tanda-tanda toksisitas, maka diperlukan observasi tambahan. Pengamatan meliputi perubahan pada kulit dan bulu, mata dan membran mukosa, sistem pernapasan, sistem sirkulasi, sistem saraf otonom dan sistem saraf pusat, serta aktivitas somatomotor dan pola perilaku. Perhatian khusus harus diberikan terhadap adanya tremor, kejang, salivasi, diare, letargi, tidur berlebihan, maupun koma. Prinsip dan kriteria yang dirangkum dalam *Humane Endpoints Guidance Document* harus dipertimbangkan dalam pelaksanaan penelitian. Hewan yang berada dalam kondisi moribund atau menunjukkan rasa sakit berat maupun tanda-tanda penderitaan berat yang menetap harus dieliminasi secara humanis. Apabila hewan dieliminasi karena alasan kesejahteraan atau ditemukan mati, waktu kematian harus dicatat seakurat mungkin.

Berat badan masing-masing hewan harus ditentukan sesaat sebelum pemberian bahan uji dan setidaknya satu kali setiap minggu setelahnya. Perubahan berat badan dihitung dan dicatat sebagai bagian dari evaluasi kondisi umum hewan selama penelitian. Pada akhir penelitian, hewan yang masih hidup ditimbang kembali sebelum kemudian dieliminasi secara humanis sesuai dengan prosedur yang berlaku.

Semua hewan, termasuk yang mati selama pengujian atau yang dikeluarkan dari penelitian karena alasan kesejahteraan hewan, harus menjalani pemeriksaan nekropsi secara makroskopis. Setiap perubahan patologis yang tampak secara kasat mata harus dicatat untuk masing-masing hewan. Selain itu, pemeriksaan mikroskopis terhadap organ yang menunjukkan adanya kelainan makroskopis pada hewan yang bertahan hidup selama 24 jam atau lebih setelah pemberian dosis awal dapat dipertimbangkan, karena pemeriksaan tersebut berpotensi memberikan informasi tambahan yang bermanfaat dalam evaluasi toksisitas bahan uji.



Contoh kriteria penghentian (c) dari perangkat lunak mandiri untuk Pedoman OECD 425

### Cara penggunaan aplikasi AOT425StatPgm

Program AOT425StatPgm diinstal pada sistem operasi Windows dengan menjalankan file instalasi AOT425Setup.exe, yang akan mengekstrak file instalasi ke folder sementara, kemudian pengguna menjalankan file Setup.exe untuk menyelesaikan proses instalasi. Program secara default terpasang di folder C:\Program Files\AOT425StatPgm dan shortcut akan muncul di Start Menu. Jika terdapat versi sebelumnya, program harus dihapus terlebih dahulu sebelum melakukan instalasi ulang. Setelah terinstal, program dapat dijalankan untuk mulai memasukkan dan menganalisis data uji toksisitas akut oral berdasarkan OECD Test Guideline 425.

Saat program dibuka, pengguna bekerja pada jendela utama yang disebut Data Edit Window. Pada bagian header, pengguna mengisi informasi mengenai deskripsi zat uji, jenis pengujian (Main Test atau Limit Test), batas dosis (2000 atau 5000 mg/kg untuk limit test), serta nilai asumsi LD50 dan sigma untuk main test. Selanjutnya, data hewan dimasukkan dalam bentuk tabel yang memuat nomor urut pengujian, ID hewan, dosis aktual yang diberikan, hasil pengamatan jangka pendek (hidup atau mati dalam 48 jam), dan hasil pengamatan jangka panjang (hidup atau mati hingga 14 hari). Program secara otomatis memberikan rekomendasi dosis berikutnya berdasarkan respon hewan sebelumnya serta menampilkan pesan apabila terdapat kesalahan input atau kondisi yang tidak sesuai prosedur. Data dapat disimpan dalam format file teks (.dat), dibuka kembali untuk melanjutkan pengujian, dan dilengkapi dengan fitur pemulihan data apabila terjadi

gangguan.

Setelah seluruh data, termasuk hasil jangka panjang, dimasukkan, pengguna dapat menghasilkan laporan analisis melalui menu Get Report. Laporan tersebut memuat informasi lengkap mengenai identitas uji, jenis pengujian, urutan dosis yang direkomendasikan dan yang diberikan, hasil tiap hewan, ringkasan jumlah hewan hidup dan mati pada setiap dosis, serta estimasi LD50 beserta interval kepercayaan (confidence interval). Perhitungan LD50 dilakukan menggunakan metode maximum likelihood dan interval kepercayaan dihitung dengan pendekatan profile likelihood sesuai implementasi pedoman OECD 425. Laporan dapat dicetak atau disimpan dalam format teks untuk keperluan dokumentasi dan pelaporan hasil penelitian.

Test Seq.	Animal ID	Dose (mg/kg)	Short-term Result	Long-term Result
1	1	175	O	O
2	2	550	X	X
3	3	175	O	O
4	4	550	O	O
5	5	2000	X	X
6	6	550	O	O
7	7	2000	O	O
8	8	2000	O	O
9	9	2000	O	O

(X = Died, O = Survived)

Dose Recommendation: The main test is complete.  
Stopping criteria met: 3 at Limit Dose.

SUMMARY OF LONG-TERM RESULTS:

Dose	O	X	Total
175	2	0	2
550	2	1	3
2000	3	1	4
All Doses	7	2	9

Statistical Estimate based on long term outcomes:  
Estimated LD50 = 10890 (Based on maximum likelihood).  
95% PL Confidence interval is 0 to Greater than 20,000.

contoh pelaksanaan dan analisis Main Test  
pada metode *Up-and-Down Procedure* (OECD 425)

## B. Tujuan Praktikum

1. Menentukan LD<sub>50</sub> zat uji pada mencit menggunakan metode OECD 425.
2. Mengamati gejala toksisitas akut dan perubahan fisiologis pada mencit.

## C. Alat dan Bahan

1. Mencit betina sehat (20–30 g), minimal 6 ekor.
2. Sediaan zat uji, pelarut, jika zat uji tidak larut dalam air (misal: Na-CMC 1%).

3. Timbangan analitik, sonde oral, kandang, alat pencatat data.

#### **D. Prosedur Kerja**

1. Persiapan Hewan Uji
  - a. Aklimatisasi mencit minimal 5 hari.
  - b. Pastikan bobot badan dalam rentang  $\pm 20\%$  dari rata-rata
2. Buat Sediaan Uji, larutkan sediaan uji dalam pelarut yang sesuai
3. Limit Test (Uji Batas)

Tujuan:

Menentukan apakah  $LD_{50} > 2000$  mg/kgBB (untuk zat yang diduga toksisitas rendah).

Prosedur:

Berikan dosis 2000 mg/kgBB pada 1 mencit secara oral. Jika hewan bertahan setelah 48 jam, berikan dosis yang sama pada 4 mencit tambahan. Jika semua 5 hewan bertahan hingga hari ke-14,  $LD_{50}$  dinyatakan  $>2000$  mg/kgBB. Jika ada kematian, lanjutkan ke Main Test.

#### 4. Main Test (Uji Utama)

Prinsip:

Penentuan dosis secara dinamis berdasarkan respons hewan sebelumnya.

Prosedur:

Dosis awal: Jika tidak ada data pendahuluan, gunakan 175 mg/kgBB. Jika ada informasi toksisitas, pilih dosis yang sesuai.

Pemberian dosis: Berikan dosis ke 1 mencit, amati selama 48 jam. Jika bertahan: Naikkan dosis berikutnya dengan faktor 3,2x (misal: 175 → 550 mg/kgBB).

Jika mati: Turunkan dosis dengan faktor 3,2x (misal: 175 → 55 mg/kgBB). Lanjutkan proses hingga memenuhi kriteria berhenti: Minimal 6 hewan diuji. Terbentuk pola "naik-turun" yang stabil (misal: 3 hewan bertahan di dosis tinggi, 3 mati di dosis rendah), atau ikuti perintah pada aplikasi AOT425StatPgm

#### 5. Pengamatan:

- a. Amati tanda-tanda toksisitas (letargi, tremor, kejang, gangguan pernapasan, dll) setiap 30 menit selama 4 jam pertama, lalu harian hingga 14 hari<sup>[5]</sup>.
- b. Catat bobot badan awal, hari ke-7, dan hari ke-14.
- c. Catat kematian dan waktu kematian.
- d. Setelah 14 hari, lakukan nekropsi pada semua hewan untuk melihat perubahan organ target (hati, ginjal, jantung).

## **E. Format Laporan**

1. Pendahuluan
2. Metode
3. Hasil
4. Pembahasan
5. Kesimpulan

## **F. Referensi**

OECD Guideline 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure

## **G. Quiz**

Kerjakan quiz berikut ini!

1. Jelaskan perbedaan utama antara limit test dan main test pada OECD 425!
2. Dalam kondisi bagaimana limit test pada dosis 2000 mg/kg dapat digunakan?
3. Jika pada limit test 5000 mg/kg terdapat tiga kematian dari lima hewan uji, bagaimana interpretasi nilai LD50?
4. Mengapa metode OECD 425 disebut sebagai metode Up-and-Down Procedure?
5. Jelaskan bagaimana penentuan dosis berikutnya dalam main test dilakukan!
6. Berapa lama periode observasi standar dalam uji toksisitas akut oral menurut OECD 425, dan mengapa durasi tersebut penting?
7. Sebutkan parameter klinis yang diamati selama periode observasi pada hewan uji!
8. Apa yang dimaksud dengan humane endpoints, dan mengapa konsep ini penting dalam uji toksisitas?
9. Mengapa semua hewan, termasuk yang mati selama pengujian, harus dilakukan nekropsi?
10. Jelaskan hubungan antara hasil uji LD50 dengan klasifikasi bahaya berdasarkan sistem GHS!

**BAB IV**  
**UJI TOKSISITAS AKUT ORAL MENGGUNAKAN METODE**  
***BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT)***

**PRAKTIKUM XIV & XV**

**A. Pendahuluan**

Uji toksisitas akut merupakan salah satu tahapan awal dalam evaluasi keamanan suatu bahan. Uji ini bertujuan untuk mengetahui efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian tunggal atau paparan jangka pendek suatu zat. Parameter yang umum digunakan dalam uji toksisitas akut adalah nilai LC<sub>50</sub> (Lethal Concentration 50%) atau LD<sub>50</sub> (Lethal Dose 50%), yaitu konsentrasi atau dosis yang mampu menyebabkan kematian 50% organisme uji. Nilai ini memberikan gambaran kuantitatif mengenai tingkat bahaya suatu zat dan sering digunakan sebagai dasar klasifikasi toksisitas.

Dalam penelitian bahan alam dan penemuan obat baru, diperlukan metode skrining awal yang cepat, ekonomis, dan memiliki sensitivitas biologis yang memadai sebelum dilakukan uji lanjutan yang lebih kompleks dan mahal. Salah satu metode skrining yang banyak digunakan adalah Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Meyer et al. (1982) sebagai bioassay umum untuk mendeteksi senyawa aktif dari ekstrak tumbuhan. Sejak saat itu, BSLT berkembang menjadi metode skrining yang luas digunakan dalam penelitian fitokimia, farmakologi, dan toksikologi eksperimental.

Brine Shrimp Lethality Test menggunakan larva udang air asin *Artemia salina* sebagai organisme uji. *Artemia salina* merupakan crustacea kecil yang hidup di lingkungan dengan salinitas tinggi dan memiliki siklus hidup yang relatif sederhana. Larva stadium nauplius berumur sekitar 24 jam dipilih karena berada pada fase perkembangan awal yang sensitif terhadap paparan zat kimia. Sensitivitas ini menjadikan *Artemia salina* sebagai model biologis yang efektif untuk mendeteksi potensi toksik suatu senyawa secara cepat.

Prinsip metode BSLT didasarkan pada hubungan dosis–respons, di mana peningkatan konsentrasi zat uji akan meningkatkan persentase mortalitas larva. Setelah periode paparan selama 24 jam, jumlah larva yang mati dihitung dan digunakan untuk menentukan nilai  $LC_{50}$  melalui analisis probit atau regresi logaritmik. Secara biologis, kematian larva dapat terjadi akibat gangguan sistem enzimatik, kerusakan membran sel, gangguan metabolisme energi, stres oksidatif, serta ketidakseimbangan osmoregulasi akibat paparan senyawa toksik. Respons mortalitas tersebut mencerminkan interaksi antara sifat kimia senyawa dan sistem biologis organisme uji.

Sejumlah penelitian melaporkan adanya korelasi antara hasil BSLT dengan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker serta bioaktivitas lainnya, sehingga metode ini sering digunakan sebagai indikator awal potensi antitumor dan aktivitas farmakologis lainnya. Selain itu, metode ini memiliki beberapa keunggulan, antara lain prosedur yang sederhana, waktu pengujian yang relatif singkat, biaya yang rendah, serta tidak memerlukan peralatan laboratorium yang kompleks. Hal tersebut menjadikan BSLT sebagai metode yang sesuai untuk penelitian tingkat sarjana maupun tahap awal penelitian pengembangan obat. Meskipun demikian, metode BSLT memiliki keterbatasan karena hanya memberikan gambaran toksisitas umum dan tidak secara langsung mencerminkan efek toksik sistemik pada mamalia. Oleh karena itu, hasil uji ini harus diinterpretasikan sebagai data skrining awal yang memerlukan konfirmasi melalui uji toksisitas lanjutan yang lebih spesifik.

## **B. Tujuan Praktikum**

1. Memahami prinsip ilmiah dan konsep dasar uji toksisitas akut menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT).
2. Melaksanakan prosedur uji BSLT secara sistematis, mulai dari penetasan larva *Artemia salina*, pembuatan seri konsentrasi, hingga pengamatan mortalitas.
3. Menganalisis dan menginterpretasikan data hasil pengujian untuk menentukan nilai  $LC_{50}$  serta tingkat toksisitas sampel uji.

### **C. Alat dan Bahan**

#### **Alat:**

1. Timbangan analitik
2. Blender atau alat penghalus simplisia (jika menggunakan bahan alam)
3. Rotary evaporator (jika tersedia, untuk penguapan pelarut ekstrak)
4. Gelas ukur
5. Beaker glass
6. Labu ukur
7. Pipet tetes
8. Mikropipet beserta tip
9. Tabung reaksi atau vial uji ( $\pm 10$  mL)
10. Rak tabung reaksi
11. Batang pengaduk
12. Wadah penetasan *Artemia salina* (dua kompartemen terang-gelap)
13. Aerator dan selang udara
14. Lampu pijar 15–25 watt
15. Kaca pembesar atau mikroskop
16. pH meter (jika tersedia)
17. Termometer (untuk memantau suhu ruangan)

#### **Bahan:**

1. Telur *Artemia salina*
2. Natrium klorida (NaCl) atau garam laut
3. Aquadest
4. Sampel uji
5. Dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai pelarut pembantu
6. Aluminium foil

#### D. Prosedur Kerja

1. Siapkan air laut buatan dengan melarutkan 38 gram natrium klorida (NaCl) ke dalam 1 liter aquadest, kemudian aduk hingga homogen. Pastikan pH larutan berada pada kisaran 7–8,5 dan simpan pada suhu ruang sebagai media penetasan dan media uji.
2. Siapkan wadah penetasan yang dibagi menjadi dua kompartemen (terang dan gelap), lalu isi dengan air laut buatan. Tambahkan telur *Artemia salina* secukupnya ( $\pm 1$  gram untuk skala laboratorium), kemudian pasang aerator untuk memberikan suplai oksigen secara kontinu selama 24–48 jam. Nyalakan lampu pijar 15–25 watt selama proses penetasan untuk merangsang penetasan telur.
3. Setelah 24–48 jam, telur akan menetas menjadi larva (nauplius). Ambil larva berumur  $\pm 24$  jam yang aktif dan bergerak lincah dari sisi terang menggunakan pipet tetes, kemudian kumpulkan sebagai hewan uji.
4. Timbang sampel uji secara akurat untuk membuat larutan stok, misalnya dengan konsentrasi 1000 ppm. Jika sampel tidak larut dalam air laut buatan, larutkan terlebih dahulu dalam sedikit dimetil sulfoksida (DMSO), kemudian tambahkan air laut buatan hingga mencapai volume yang ditentukan dan homogenkan. Pastikan konsentrasi akhir DMSO dalam larutan uji tidak melebihi 1%.
5. Dari larutan stok tersebut, lakukan pengenceran bertingkat untuk memperoleh beberapa variasi konsentrasi uji, misalnya 10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm. Siapkan masing-masing konsentrasi dalam tiga kali replikasi. Selain itu, siapkan kontrol negatif yang hanya berisi air laut buatan serta kontrol pelarut apabila digunakan DMSO.
6. Masukkan 10 larva *Artemia salina* berumur  $\pm 24$  jam ke dalam setiap vial uji menggunakan pipet tetes. Tambahkan larutan uji sesuai konsentrasi hingga volume akhir masing-masing vial menjadi 10 mL. Pastikan jumlah larva pada setiap vial sama untuk menjaga konsistensi data.
7. Inkubasi seluruh vial selama 24 jam pada suhu ruang (25–30°C) tanpa pemberian pakan dan tanpa aerasi tambahan. Letakkan vial pada tempat yang cukup terang tetapi tidak terkena sinar matahari langsung.

8. Setelah 24 jam masa inkubasi, lakukan pengamatan dengan menghitung jumlah larva yang mati pada masing-masing konsentrasi dan replikasi. Larva dinyatakan mati apabila tidak menunjukkan pergerakan selama  $\pm 10$  detik meskipun telah disentuh atau digoyangkan secara perlahan. Catat jumlah larva hidup dan mati pada tabel pengamatan.
9. Jika terdapat kematian pada kelompok kontrol, lakukan koreksi persentase mortalitas menggunakan rumus Abbott sebelum dilakukan analisis lebih lanjut untuk penentuan nilai  $LC_{50}$ .

### E. Data Pengamatan

**Tabel data mortalitas larva *artemia salina***

Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Jumlah Larva	Jumlah Mati	Jumlah Hidup	% Mortalitas
Kontrol	1	10			
	2	10			
	3	10			
ppm	1	10			
	2	10			
	3	10			

### Perhitungan Persentase Mortalitas

$$\% \text{Mortalitas} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah total larva}} \times 100\%$$

Jika terdapat kematian pada kontrol, gunakan rumus Abbott:

$$\% \text{Mortalitas Terkoreksi} = \frac{(M_t - M_k)}{(100 - M_k)} \times 100\%$$

Keterangan:

Mt = % mortalitas perlakuan

Mk = % mortalitas kontrol

### Tabel Analisis LC<sub>50</sub>

Konentrasi (ppm)	Log konsentrasi	% Mortalitas	Nilai probit

### F. Refrensi

Zakaria, H., dkk. (2024). Uji toksisitas ekstrak menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Elkawnie: Journal of Islamic Science and Technology*.

### G. Quiz

Kerjakanlah quiz berikut ini!

1. Jelaskan prinsip dasar metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT).
2. Mengapa larva *Artemia salina* berumur 24 jam dipilih sebagai organisme uji?
3. Apa yang dimaksud dengan LC<sub>50</sub> dan bagaimana cara menentukannya?
4. Mengapa diperlukan kontrol negatif dalam uji BSLT?
5. Apa fungsi penggunaan DMSO dalam pengujian?
6. Mengapa analisis probit digunakan dalam perhitungan LC<sub>50</sub>?
7. Bagaimana hubungan antara konsentrasi dan persentase mortalitas?
8. Jelaskan mekanisme umum kematian larva akibat senyawa toksik.
9. Apa kelebihan dan keterbatasan metode BSLT dibandingkan uji toksisitas pada mamalia?
10. Bagaimana interpretasi hasil jika diperoleh nilai LC<sub>50</sub> sebesar 75 ppm?