

**PENUNTUN PRAKTIKUM
TOKSIKOLOGI**



Nama Mahasiswa	:	
NIM	:	
Semester/Kelas	:	
Dosen	:	

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS BINAWAN
JAKARTA
2022**

VISI DAN MISI
PROGRAM STUDI S1 FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS BINAWAN

Visi

“Menjadi Prodi Farmasi Unggulan di Indonesia pada tahun 2025 dengan meluluskan tenaga teknis kefarmasian yang berakhlak dan dapat bersaing secara nasional maupun global”

Misi

1. Menyelenggarakan pendidikan kefarmasian yang berfokus kepada obat bahan alam, klinis komunitas dan pharmapreneur sesuai dengan perkembangan IPTEK agar dapat bersaing secara nasional dan global.
2. Mengembangkan penelitian kefarmasian khususnya dalam bidang obat bahan alam, klinis komunitas dan pharmapreneur.
3. Melakukan pengabdian masyarakat melalui pendekatan farmasi yang berorientasi pada obat bahan alam, klinis komunitas, dan pharmapreneur.
4. Melaksanakan perintisan dan pengembangan jejaring (*net working*) kemitraan di bidang kefarmasian pada tingkat nasional dan internasional.
5. Menghasilkan lulusan yang bertaqwa dan berbudi pekerti luhur serta terampil dalam dunia kefarmasian.

LEMBAR PENGESAHAN

Penuntun Praktikum Toksikologi
Program Studi S1 Farmasi

Oleh:

Aji Humaedi, S.Si., M.Farm
(Dosen Pengampu Praktikum)

Jakarta, Januari 2022

Menyetujui,




apt. Ernie Halimatushadyah, M.Farm

(Ka. Prodi Farmasi)

Mengetahui




Mia Srimati S.Gz., M.Gz

(Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan dan Teknologi)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Penuntun Praktikum Toksikologi bagi mahasiswa Farmasi BINAWAN. Buku ini disusun dengan maksud agar mahasiswa dapat melaksanakan praktikum dengan baik dan mudah.

Praktikum Toksikologi dimaksudkan untuk mengimbangi kemampuan mahasiswa dalam menghadapi perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi. Agar terjadi proses perkuliahan yang mengarah pada peningkatan skill mahasiswa dalam menghadapi tantangan, maka sudah selayaknya dilakukan pendalaman materi yang terfokus pada realitas di lapangan.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan yang terdapat dalam buku ini, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan dan semoga buku ini bermanfaat bagi semua pihak.

Jakarta, Januari 2022

Peyusun

DAFTAR ISI

Halaman Sampul	i
Visi dan Misi	ii
Lembar Pengesahan	iii
Kata Pengantar	iv
Daftar Isi	v
Pendahuluan	vi
Modul 1 Penanganan Hewan Uji.....	1
Modul 2 Asas Umum Uji Toksikologi	10
Modul 3 Uji Ketoksikan Akut.....	18
Modul 4 Uji Cholinesterase.....	22
Modul 5 Uji Logam Berat	25

PENDAHULUAN

PRAKTIKUM TOKSIKOLOGI

Capaian Pembelajaran:

- Mahasiswa bisa terampil bekerja dengan beberapa hewan percobaan, antara lain: mencit, tikus, kelinci.
- Dapat mengaplikasikan prinsip farmakologi yang diperoleh secara teoritis.
- Mampu menerapkan dan memodifikasi metoda–metoda toksikologi
- Mampu memberikan penilaian terhadap hasil-hasil eksperimen yang diperoleh.
- Mampu memberikan tafsiran mengenai implikasi praktis dari hasil-hasil eksperimen.

Dosen Pengajar:

1. Aji Humaedi, M.Farm
- 2.

Laboran

1. Siti Kartika Hasyim, S.Si
2. Dhea Arlia, Amd

Pelaksanaan Praktikum

1. Pembagian kelompok
2. Waktu : setiap sesi praktikum dilaksanakan selama 2 jam
3. Pre test
4. Responsi

Responsi diselenggarakan setiap selesai satu modul praktikum. Mahasiswa wajib mempersiapkan diri untuk mengikuti responsi. Responsi akan membahas hasil praktikum dan landasan teorinya.

5. Tata tertib praktikum
 - a. Praktikan diharuskan memakai jas dan sandal lab yang bersih

- b. Peralatan khusus yang harus dibawa:
- c. Absensi/kehadiran praktikum 100%. Apabila berhalangan hadir harus ada keterangan resmi. Syarat ikut ujian minimal kehadiran 80%
- d. Disiplin kerja
 - Praktikan sudah siap di laboratorium 5 menit sebelum praktikum dimulai. Praktikan yang datang terlambat akan diberikan sanksi
 - Pekerjaan dilakukan dalam kelompok
 - Tanggung jawab pengerjaan tugas merupakan tanggung jawab bersama
 - Semua peralatan harus bersih baik pada saat pengerjaan maupun pada saat akhir praktikum
 - Alat praktikum diperiksa terlebih dahulu sebelum melakukan praktikum. Kehilangan alat setelah praktikum merupakan tanggung jawab pemilik meja/kelompok praktikum

6. Jurnal Praktikum

7. Laporan Praktikum

Mahasiswa wajib membuat laporan praktikum yang dikumpulkan pada saat responsi.

Format laporan:

- Hasil
- Pembahasan
- Pustaka

MODUL 1

PENANGANAN HEWAN UJI

1.1 CAPAIAN PEMBELAJARAN MATA KULIAH

Setelah menyelesaikan praktikum ini, mahasiswa diharapkan :

1. Mahasiswa mengenal tata cara baku penanganan hewan uji serta pengaruhnya terhadap kesahihan (validitas) hasil uji toksikologi.

1.2. DASAR TEORI

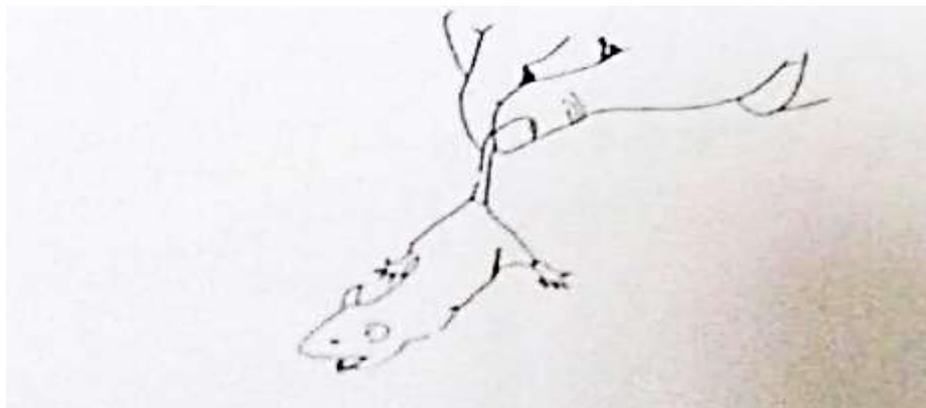
Yang dimaksud adalah tata cara memperlakukan hewan uji, baik selama masa pemeliharaan maupun uji toksikologi berlangsung. Dalam hal ini terlihat berbagai macam teknik, yakni pengambilan hewan dari kandang, pemegangan, penandaan, pemberian senyawa, pengorbanan, dan pengambilan cuplikan hayati.

Berhubung untuk keperluan uji toksikologi, hewan uji yang paling banyak digunakan ialah mencit dan tikus, maka para mahasiswa akan diperkenalkan terhadap penanganan hewan uji tersebut.

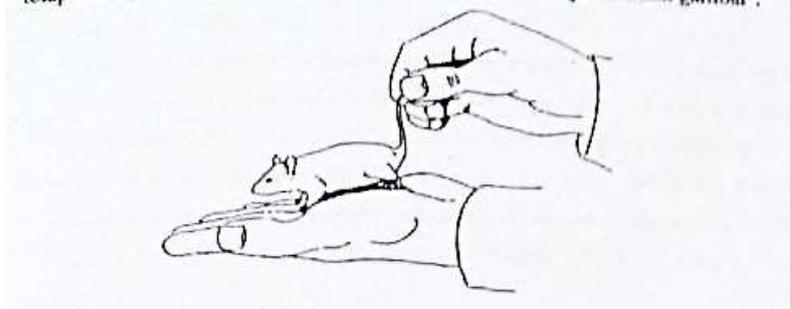
1. MENCIT

Pengambilan:

Pengambilan mencit dari kandang harus dilakukan dengan hati-hati karena mencit merupakan hewan yang selalu berusaha untuk mengigit dan mampu meloncat sampai beberapa meter, bila tersentuh. Karena itu, pertama kali bukalah kandang dengan hati-hati. Jangan membuka penutup kandang seluruhnya, melainkan cukup untuk masuk tangan saja. Kemudian angkat mencit dengan cara memegang ekor mencit (3-4 cm dari ujung). Lihat gambar:



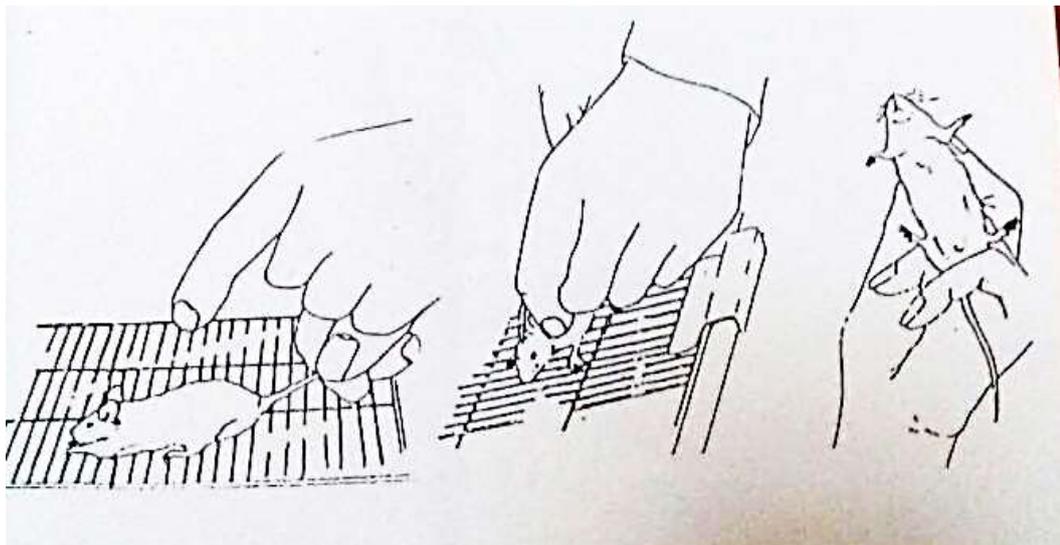
Dengan cara demikian mencit dapat dipindahkan ketempat lain. Selain itu, dengan tetap dipegang pada ekornya, bila perlu mencit dapat diletakkan pada telapak tangan guna pemeriksaan dan pengamatan lebih jauh. Lihat gambar:



Pemegangan:

Mencit dapat dipegang sbb:

- a. Letakkan mencit pada lembaran kawat, biarkan keempat kakinya mencengkram kawat atau alas kasar lain. Dalam keadaan demikian mencit dapat diberi tanda dengan asam pikrat atau tinta cina sebagaimana mestinya.
- b. Dengan tangan kiri, jepit kulit tengkuk diantara telunjuk dan ibu jari.
- c. Pindahkan ekor dari tangan kanan ke antara jari manis dan jari kelingking tangan kiri, sampai mencit dapat dipegang dengan erat, mencit siap mendapat perlakuan.



Pemberian/pemejanaan sediaan uji:

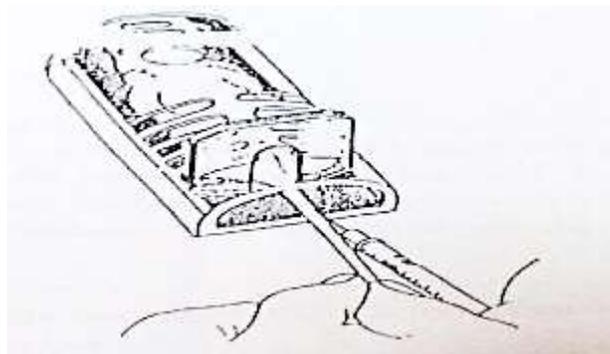
Pemberian/pemejanaan sediaan uji pada mencit dapat melalui beberapa jalur, oral, intravena, intraperitoneal, intramuscular dan subkutan

a. Pemberiaan melalui oral:

Dilakukan dengan cara memegang mencit, masukkan keteter polietilen (ukuran A2-3fg, panjang 2-3 cm) dengan jarum tumpul ukuran 18 G yang berisi larutan, suspensi, atau emulsi senyawa uji, melalui mulut dengan cara menelusurkan searah tepi langit-langit ke arah beakang sampai esophagus, semprotkan senyawa uji elan-pelan setelah pemberian selesai tarik pelan-pelan alat tsb. Dapat juga digunakan tuberculin dengan ujung tumpul.

b. Pemberian intravena

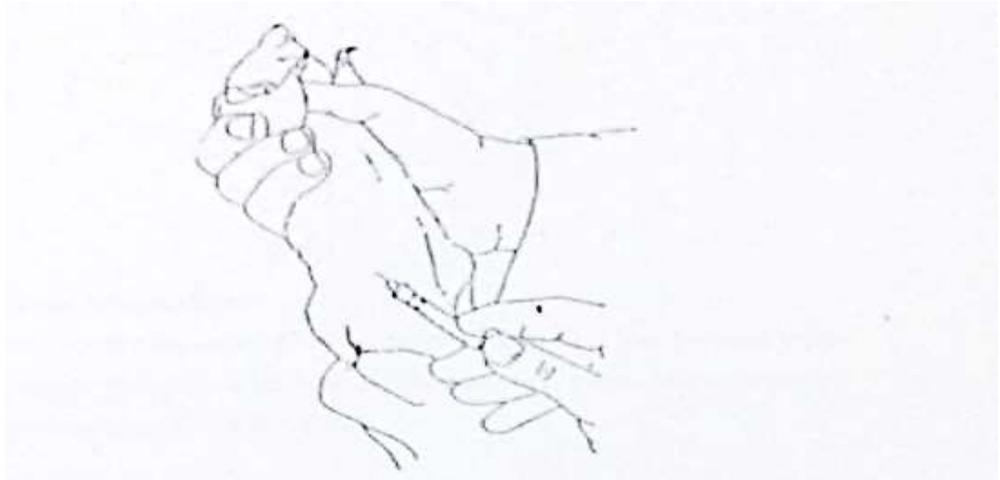
Dilakukan dengan cara memasukkan mencit ke dalam sangkar, selanjutnya celupkan ekornya ke dalam air hangat (dilatasi vena lateralis). Setelah vena mengalami dilatasi (melebar), pegang ekor mencit dengan kuat dengan posisi vena berada dipermukaan sebelah atas. Tusukkan jarum suntik no 24 ke dalam vena sejajar dengan vena, lebih kurang 1 cm, semprotkan larutan uji dan tarik perlahan-lahan jarum suntik, dan tekan tempat suntikan dengan kapas beralkohol.



c. Pemberian intraperitoneal:

dilakukan dengan cara memegang mencit dengan kulit punggung dijepit. Sehingga daerah perut terasa tegang. Basahi daerah perut dengan kapas beralkohol. Tusukkan jarum suntik (No.18) sejajar dengan salah satu kaki

mencit, pada daerah perut lebih kurang 1 cm diatas kelamin. Semprotkan senyawa uji. Setelah selesai pemberian, tarik perlahan-lahan jarum suntik dan tekan tempat suntikan dengan kapas beralkohol. Hati-hati penyuntikan jangan sampai kena hati, kandung kemih atau usus. Karena rongga perut terletak antara kandung kencing dan hati.

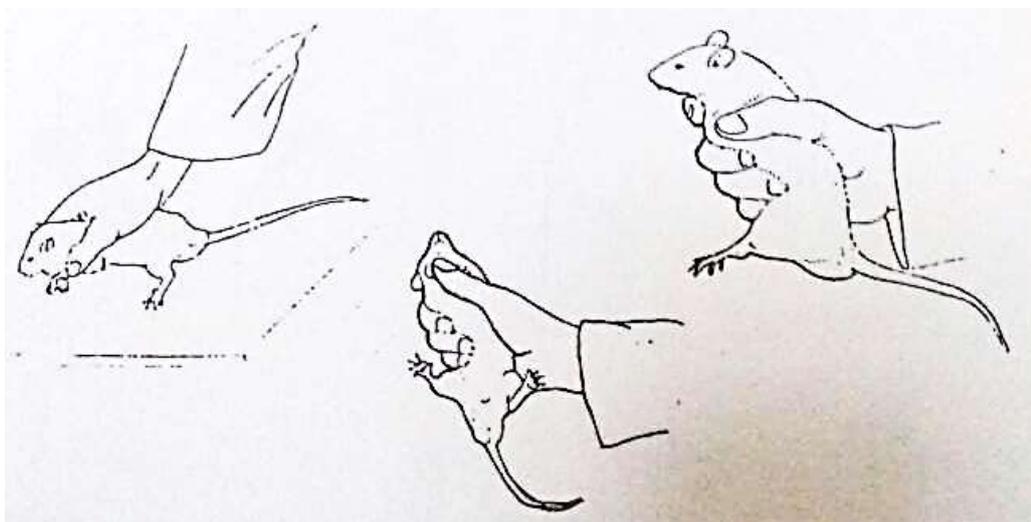


d. Pemberian intra muskular

Dilakukan dengan cara memegang mencit dengan bantuan teman. Usap daerah otot paha posterior dengan kapas beralkohol. Suntikkan larutan senyawa uji pada daerah otot tersebut, setelah selesai cabut perlahan jarum suntik, dan tekan daerah suntikan dengan kapas beralkohol.

e. Pemberian subkutan

Diberikan dengan cara melalui sela-sela jepitan pada tengkuk suntikan cairan ke bawah kulit.



Pengambilan cuplikan hayati:

Cuplikan hayati yang sering diambil meliputi: darah, urin, dan berbagai organ tubuh seperti lambung usus, hati limfa, pankreas, ginjal, uterus, ovarim, testis, jantung, paru, tiroid dan otak.

Pengambilan darah:

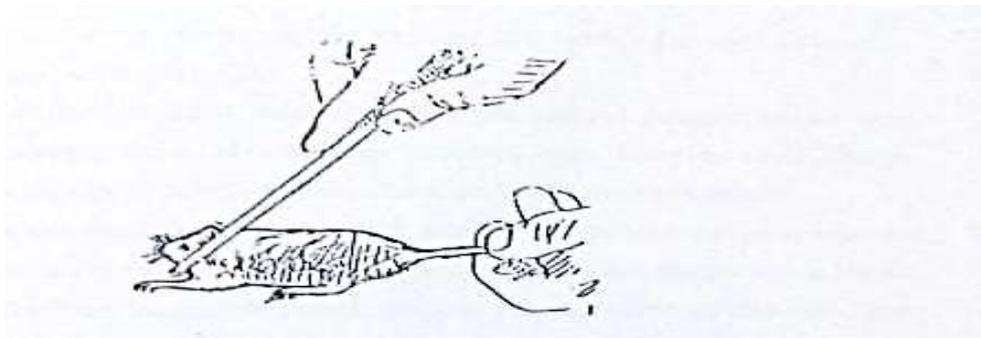
Dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a. Peganglah punggung mencit
- b. Ambillah pipa kapiler dan siapkan tabung penampung darah berheparin
- c. Tusukkan kapiler perlahan-lahan pada vena optalmikus yang terdapat disudut mata.
- d. Puter kapiler perlahan-lahan sampai darah keluar
- e. Tampung darah yang keluar pada tabung
- f. Setelah volume darah yang diperoleh dianggap cukup, cabut pipa kapiler dan bersihkan sisa darah yang terdapat di mata dengan kapas steril
- g. Simpan darah di almari es dengan suhu -20°C , sampai penetapan dikerjakan.

Pengorbanan :

Ada beberapa cara pengorbanan yakni cara kimia (eter atau karbondioksida dalam wadah khusus atau suntikan phenobarbital Na 135-150 mg/kgBB) dan cara fisik (dislokasi leher). Pengorbanan mencit cara fisik dilakukan sbb:

- a. Letakkan mencit pada telapak tangan dan pegangilah ekornya
- b. Tempatkan suatu penahan pada tengkuk mencit misalnya pensil.



- c. Tarik ekor mencit dengan kuat sampai tulang leher terasa terlepas.

Pengambilan organ dapat dilakukan sbb:

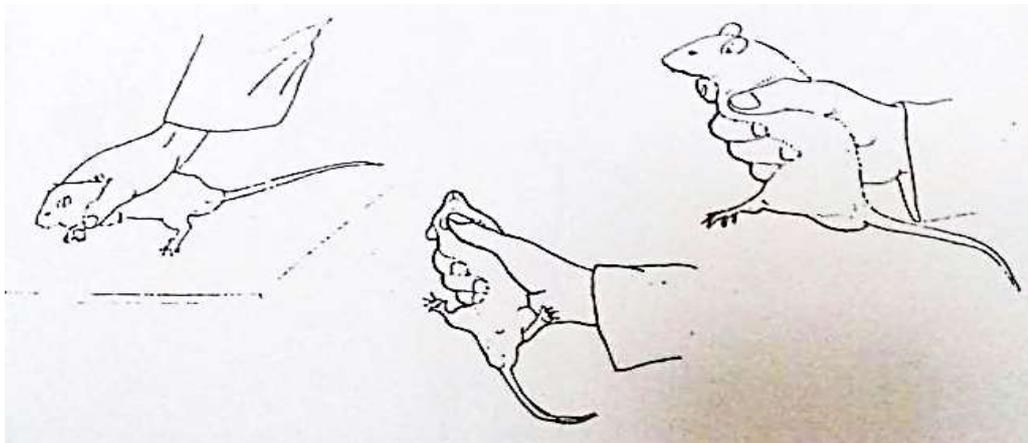
- a. Korbankan mencit dengan cara fisik
- b. Tempatkan mencit pada meja atau tempat bedah/fiksasi
- c. Terlentangkan mencit, rentangkan keempat kakinya dan tancap dengan jarum
- d. Basahi dengan air daerah disekitar perut
- e. Angkat kaki perut dengan pinset, kemudian potong dan gunting tepat dibawah pinset.
- f. Lanjutkan pemotongan kearah kiri dan kanan, serong ke atas menuju pangkal kaki depan dan serong ke bawah menuju pangkal kaki belakang, maka akan terlihat isi perut, dan rongga dada yang meliputi usus, hati dan diafragma
- g. Selanjutnya angkat seluruh bagian usus dan rentangkan. Potong lambung, duodenum, jejunum, dan ileum. Bersihkan isi lambung dan usus tersebut kemudian masukkan kedalam pot yang berisi formalin 10%.
- h. Kemudian buka rongga dada, pisahkan hatinya, balikkan hati dan potong pada jaringan ikatnya, bersihkan dan masukkan dalam pot berisi formalin 10%.
- i. Setelah hati terambil, maka akan terlihat limfa, pankreas dan ginjal. Potong keduanya, ambil pula ginjal yang menyerupai biji kopi. Uterus, ovarium, atau testis dapat diambil dari bawah perut lalu masukkan dalam pot berformalin,
- j. Bukalah tulang rusuk, potong jantung dan ambil perutnya. Masukkan kedalam pot berformalin.
- k. Kemudian buka kulit diatas rongga dada sampai pangkal trakea yang mengandung tiroid atau kelenjar tiroidnya saja. Bungkus tiroid dengan kertas perkamen sebelum dimasukkan ke dalam pot berformalin
- l. Untuk mengambil otak, buka kulit kepala lalu potong pangkal lehernya sampai terlihat medula spinalisnya, potong pada garis tengah batok kepala. Ambil tulang tengkorak kearah kiri dan kanan. Segera terlihat otak besar

dan kecil berwarna putih dibawah tulang tengkorak. Ambil otaknya dan masukkan ke dalam pot berformaling.

2. TIKUS

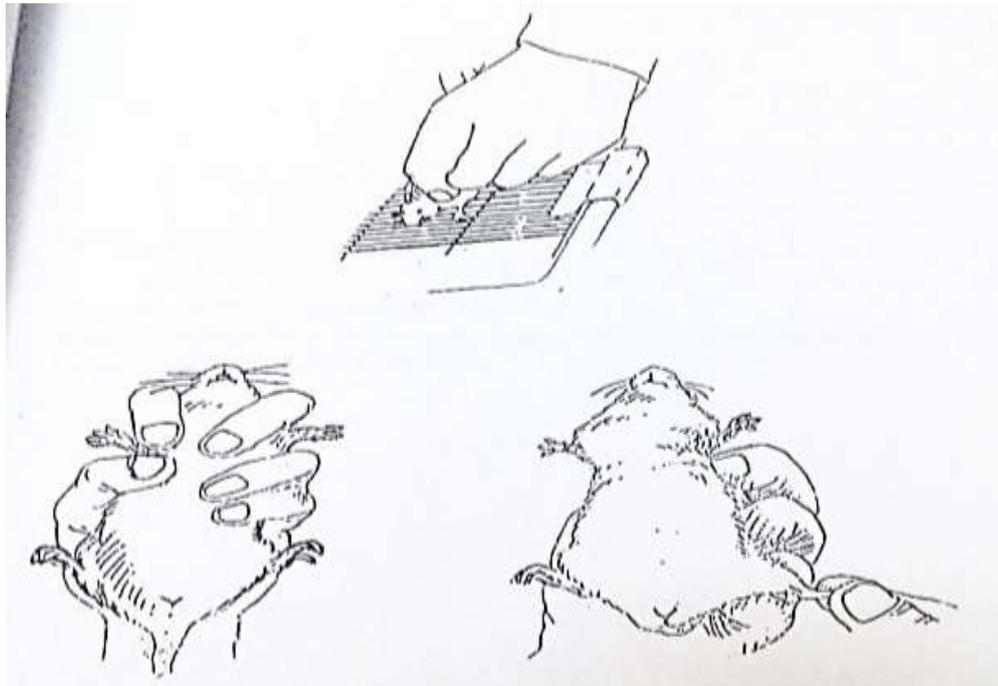
Pengambilan

Pengambilan tikus dari kandang sebaiknya tidak dilakukan dengan memegang ekor seperti mencit karena tikus akan menjadi stress dan mengalami luka. Sebaiknya dipegang pada pangkal ekornya atau dipegang seputar bahu.



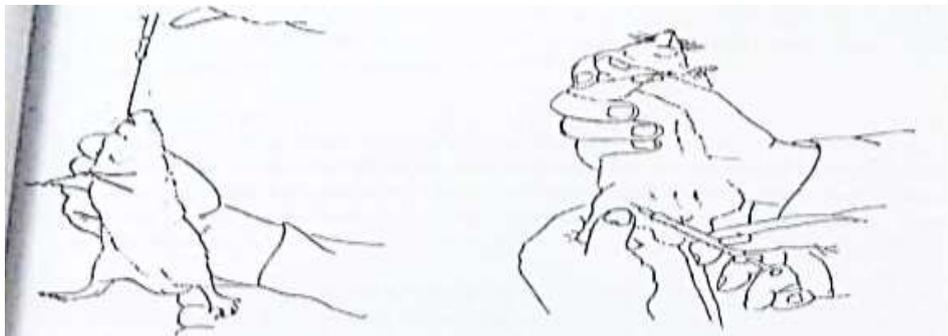
Pemegangan

Angkat tikus dari kandang pada pangkal ekornya dengan tangan kanan. Biarkan tikus mencengkeram alas kasar atau kawat seperti mencit. Lalu luncurkan tangan kiri dari belakang tubuhnya/punggung kearah kepala. Selipkan tengkuk tikus diantara jari tengah dan telunjuk. Ibu jari, jari manis dan kelingking diselipkan disekitar perut.



Pemberian / pemejanaan sediaan uji:

Pada umumnya meliputi pemberian oral, intravena, intraperitoneal, intramuscular dan subcutan. Cara nya seperti pada mencit kecuali pada pemberian subkutan dapat diberikan pada daerah perut.



Pengorbanan dan pengambilan cuplikan hayati:

Dapat dikerjakan sama seperti mencit, untuk pengambilan darah dilakukan dari vena lateralis (ekor) tikus.

FIGURE 13
INTRAVENOUS INJECTION INTO A RABBIT'S MARGINAL VEIN OF THE EAR
 (Injection with the right hand and the ear held with the left hand)

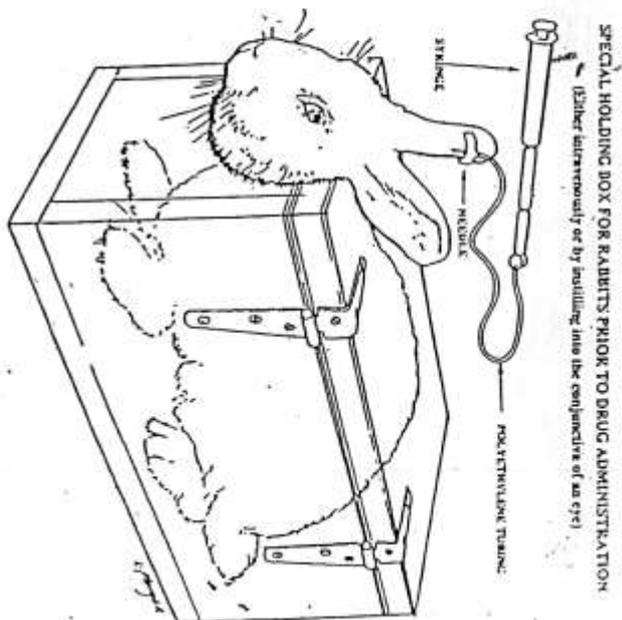
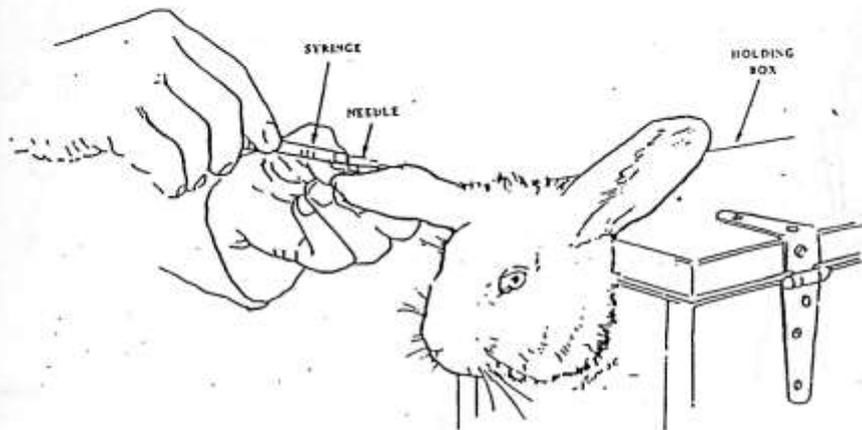
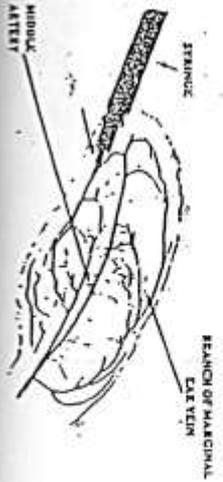


FIGURE 15
RABBIT'S MARGINAL EAR VEINS AND ARTERIES
 (Syringe and needle in blood vessel)



MODUL II

ASAS UMUM UJI TOKSIKOLOGI

2.1.CAPAIAN PEMBELAJARAN MATA KULIAH

Mahasiswa mampu memahami jenis uji toksikologi dan berbagai faktor yang dapat mempengaruhi keshahihan (validitas) uji toksikologi.

2.2.DASAR TEORI

Uji toksikologi diperlukan untuk penapisan spektrum efek toksik suatu senyawa. Agar keshahihan uji toksikologi dapat diandalkan diperlukan pengendalian terhadap aneka faktor yang mempengaruhi keshahihan tersebut. Maka mahasiswa harus faham terhadap jenis uji toksikologi dan berbagai faktor yang mungkin dapat mempengaruhinya.

Penggolongan Uji Toksikologi

Uji toksikologi dibagi menjadi dua golongan yaitu:

1. Uji ketoksikan tak khas:

Yaitu uji toksikologi yang dirancang untuk mengevaluasi keseluruhan atau spectrum efek toksik sesuatu pada aneka ragam jenis hewan uji.

Yaitu termasuk dalam uji ini antara lain:

a. Uji ketoksikan akut:

Untuk menentukan potensi ketoksikan akut (kisaran dosis letal/toksik) sesuatu senyawa yang dikerjakan / dipejankan kepada subjek uji dengan takaran/dosis tunggal juga digunakan untuk menentukan spektrum efek toksik senyawa atas beberapa fungsi vital tubuh utamanya berkaitan dengan penyebab kematian seperti gerak, perilaku dan pernafasan.

b. Uji ketoksikan subkronis

Untuk menentukan spektrum efek senyawa atas semua organ dan kelenjar tubuh. setelah pemberian takaran atau dosis berulang

sampai 3 bulan dan untuk menentukan apakah efek toksik yang timbul berkerabat dengan takaran atau dosis senyawa uji dan sejauh mana ketimbalbalikan (reversibilitas) spektrum efek toksik tsb.

c. Uji ketoksikan kronis

Untuk menentukan spektrum efek toksik senyawa atas semua organ dan kelenjar tubuh. setelah pemberian takaran atau dosis berulang lebih dari 3 bulan dan untuk menentukan apakah efek toksik yang timbul lebih dari 3 bulan dan untuk menentukan apakah efek toksik yang timbul berkerabat dengan takaran atau dosis senyawa uji dan sejauh mana ketimbalbalikkan (reversibilitas) spektrum efek toksik tsb.

2. Uji ketoksikan khas:

Uji toksikologi yang dirancang untuk mengevaluasi secara rinci efek toksik yang khas sesuatu senyawa atas fungsi, organ atau kelenjar tertentu pada aneka ragam subjek uji.

Yang termasuk dalam uji ketoksikan khas antara lain:

a. Uji potensiasi

Dikerjakan untuk menentukan kemungkinan peningkatan efek toksik sesuatu senyawa dengan hadirnya senyawa lain. Misalnya untuk mengevaluasi ketoksikan sediaan obat kombinasi.

b. Uji reproduksi

Dikerjakan untuk menentukan apakah sesuatu senyawa dapat mempengaruhi kapasitas reproduksi subjek atau hewan uji tertentu meliputi efek kesuburan, embriotoksik dan efek teratogenik (cacat bawaan) sampai generasi ke tiga subjek uji. Uji reproduksi ini dibagi menjadi 3 segmen yaitu uji kesuburan (fertilisasi), uji keratogenikan, dan uji pranatal serta pascanatal

c. Uji kemutagenikan

Dikerjakan untuk menentukan pengaruh sesuatu senyawa atas sistem kode genetik. Dengan demikian, uji ini dapat digunakan untuk mnegevaluasi kemungkinan sesuatu senyawa menyebutkan perubahan, luka, atau cacat hayati yang sifatnya menurun.

d. Uji kekarsinogenikan

Dikerjakan untuk menentukan kemampuan sesuatu senyawa dalam menimbulkan tumor atau kanker pada aneka ragam jenis hewan uji, baik jangka pendek atau jangka panjang

e. Uji kulit dan mata

Dikerjakan untuk menentukan pengaruh setempat sesuatu senyawa bila bersentuhan langsung dengan kulit atau mata. Efek toksik setempat tsb, dapat berupa iritasi primer kulit, uji sensitisasi kutan, dan jji fototoksik serta uji fotoalergi

f. Uji perilaku

Dikerjakan untuk menentukan pengaruh sesuatu senyawa atas keaktifan lokomotor subjek ata hewan uji tertentu. Untuk itu terdapat beberapa jenis uji yaitu uji roda berputar, uji lapangan terbuka, uji sangkar hewan piaraan, uji sangkar rumit, uji khas. Semua uji tersebut bermanfaat guna mengetahui pengaruh atau efek toksik sesuatu senyawa atau system saraf pusat atau otak.

ANEKA RAGAM FAKTOR PENENTU KESAHIHAN UJI TOKSIKOLOGI

Keabsahan hasil uji toksikologi ditentukan oleh kecermatan dalam mempersiapkan dan menerapkan masing-masing komponen itu. Bila demikian, dapat dinyatakan bahwa beberapa komponen sistem uji toksikologi, utamanya aneka tata cara yang terkait dengan penyiapan dan penerapan rancangan uji, sediaan uji, subyek uji, pengamatan dan pengambilan cuplikan hayati, analisis data, evaluasi hasil uji dan

penarikan kesimpulan, merupakan faktor penentu kesahihan uji toksikologi.

1. Rancangan uji

Dalam memilih metodologi, seharusnya telah dipertimbangkan berbagai segi yang berkaitan dengan pengelompokan subyek uji, pemilihan subyek dan penentuan jumlahnya, keterubahan (variabilitas) antar subyek, keterubahan dalam subyek, keterubahan waktu, dan keterubahan karena perlakuan. Selain itu, pilihan metode analisis statistic yang akan diterapkan pun, sebenarnya telah melekat pada rancangan uji yang digunakan.

2. Faktor sediaan uji

a. Bentuk sediaan uji sedapat mungkin diusahakan sebagai larutan, agar dapat diberikan atau dipejankan melalui semua jenis jalur pemberian. Penggunaan suspensi atau emulsi, sebaiknya dihindari kecuali bila pemberiannya melalui oral. Maka informasi tentang kelarutan bahan uji akan membantu sekali dalam proses menyiapkan bentuk sediaan uji. Bila larut dalam air, buat sediaan larutan dalam air atau garam fisiologis.

Bila keterlarutan bahan uji dalam air terbatas, buat sediaan larutan dalam minyak nabati (misalnya minyak jagung) atau dalam pelarut organik (misal propilenglikol 40-50% dalam air atau garam fisiologis). Dan, bila bahan uji tidak larut dalam air, buat sediaan suspensi dalam tragakan, CMC, atau tilosa 0,1-1% (untuk pemberian oral). Cara lain yang dapat disarankan, tingkatkan keterlarutan bahan uji dengan suatu polimer biasanya PVP (Polivinilpirolidon) BM 10000-30000.

Untuk bahan uji yang berupa obat tradisional, cara peningkatan kelarutan diatas, dapat dikerjakan sbb:

- Ekstrak tak larut dalam air, larutkan dalam metanol, etanol atau aseton (misal 10 mg ekstrak dalam 1000 ml pelarut)
- Larutkan PVP lebih kurang 4-5 kali berat ekstrak dalam pelarut yang digunakan pada butir a sesedikit mungkin
- Campur hasil pada butir a dan butir b diatas
- Ambil pelarutnya dengan cara evaporator. Pertama kali dengan kecepatan putaran yang lambat, berikutnya dengan kecepatan penuh. Hasilnya merupakan produk yang larut dalam air.

Untuk zat kimia murni, biasanya keterlarutannya dalam air dapat ditingkatkan dengan melarutkan dalam larutan PVP 30000 5-10%. Penyiapan bentuk sediaan uji seoptimal mungkin, utamanya bermanfaat dalam upaya memelihara kehomogenan sediaan uji, sehingga besar masukan bahan uji pada subyek ini dapat selalu dipertahankan keajegannya.

- b. Penyiapan stok sediaan uji, juga perlu dipertimbangkan masak-masak, uatannya untuk keperluan uji toksikologi yang berjangka panjang. Idealnya stok sediaan uji dibuat sekaligus, secukupnya untuk perlakuan selama masa penelitian berlangsung, agar keseragaman besar dosis yang diberikan pada subyek uji dapat selalu dipertahankan. Stok sediaan perlu disimpan dalam lemari pendingin -20C. Pendingin hanya mencegah pembusukan dantimbulnya jamur tetapi tidak menjamin mencegah peruraian zat aktif yang terkandung dalam sediaan.
- c. Pilihan jalur pemberian, jalur pemberian terpilih melibatkan jalur pemberian sediaan uji yang

disarankan untuk manusia. Teknik pemberian jangan sampai keliru, perubahan patologis atau kematian hewan uji dapat terjadi karena teknik pemberian yang keliru sehingga memungkinkan terjadinya kesalahan dalam menginterpretasi dan mengevaluasi hasil uji

- d. Besar takaran atau dosis, berkisar dari dosis terendah yang sama sekali tidak menimbulkan efek toksik yang berarti sampai dosis tertinggi sama sekali menimbulkan efek toksik yang berarti pada sekelompok hewan uji. Dan khusus untuk obat, dosis terendah yang diberikan, sebaiknya meliputi dosis terapi manusia. Hal ini dapat diperhitungkan dengan beberapa cara:
1. Berdasarkan ED50 senyawa uji dari hasil uji farmakologi dengan hewan uji dan jalur pemberian yang sama
 2. Berdasarkan harga LD50 senyawa uji pada hewan uji yang sama (5-10% LD50 intravena)
 3. Berdasarkan kelipatan dosis yang disarankan untuk digunakan pada manusia (biasanya 2-10 kali dosis manusia)
 4. Mengikuti tabel konversi perhitungan dosis antar jenis hewan berdasarkan nisbah (ratio) luas permukaan badan.

Tabel konversi Perhitungan Dosis antar jenis hewan

	Mencit 20 g	Tikus 200g	Marmot 400g	Kelinci 1,5kg	Kera 4kg	Anjing 12kg	Manusia 70kg
Mencit 20 g	1.0	7.0	12.25	27.8	64.1	124.2	187.9
Tikus 200g	0.14	1.0	1.74	3.9	9.2	17.8	56.0

Marmot 400g	0.08	0.57	1.0	2.25	5.2	10.2	31.5
Kelinci 1,5kg	0.04	0.25	0.44	1.0	2.4	4.5	14.2
Kera 4kg	0.016	0.11	0.19	0.42	1.0	1.9	6.1
Anjing 12kg	0.08	0.06	0.10	0.22	0.521	1.0	3.1
Manusia 70kg	0.0026	0.0181	0.031	0.07	0.16	0.32	1.0

Contoh perhitungan:

Dosis terapi parasetamol untuk orang berat (70kg) adalah 500 mg

Berapa perkiraan dosis untuk tikus?

Jawab:

Lihat tabel konversi:

Konversi dosis manusia (70kg) ke tikus (200g) = 0.018

Dosis terapi parasetamol-tikus (200g) = $0.018 \times 500 \text{g} = 9 \text{mg} / 200 \text{gBB} = 45 \text{mg/kgBB}$

e. Kecepatan , lama dan saat pemberian

Pada umumnya sediaan uji diberikan dengan kecepatan sekali sehari, kecuali untuk kasus-kasus tertentu. Perbedaan kecepatan dan lama pemberian dapat mengakibatkan perbedaan wujud efek toksik yang ditimbulkan. Dan juga berkaitan dengan irama diurnal, irama sirkadian dan kerentanan sesuatu organ terhadap ketoksikan senyawa uji. Maka pemberian sediaan seharusnya dilakukan pada waktu yang sama (berkaitan dengan jam biologis, pagi, siang, sore, malam) atau tepat pada masa kritis perkembangan organ (misal stadium organogenesis masa bunting, dalam uji keratogenikan)

3. Faktor subjek uji:

Subyek uji yang digunakan adalah hewan uji sehat. Hasil uji nya tidak akan dimanfaatkan untuk mengevaluasi ketoksikan senyawa uji pada hewan uji melainkan untuk memperkirakan batas aman

resiko penggunaan/pemejanaan pada manusia. Hewan uji harus dipilih semirip mungkin dengan manusia terutama dalam hal sistem absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi terhadap senyawa uji. Pada umumnya hewan uji yang digunakan lebih dari 2 jenis hewan uji. Hal ini disarankan dengan asumsi bahwa bila wujud efek toksik sesuatu senyawa diperlihatkan pada beberapa jenis hewan uji, kemungkinan besar juga akan terwujud pada diri manusia.

Hewan uji harus dalam kondisi sehat, jika tidak perkembangan patologis yang terjadi selama uji toksikologi berlangsung, pemeliharaan dan penanganan hewan uji sebelum dan selama masa uji berlangsung, harus benar-benar diperhatikan.

Keberagaman berat, luas permukaan badan, kapasitas organ dan volume cairan badan antar jenis hewan uji. Hal tersebut berpengaruh terhadap daya terima maupun kerentanan hewan uji terhadap daya terima maupun kerentanan hewan uji terhadap masukan dan ketoksikan senyawa uji.

4. Faktor pengamatan dan pengambilan cuplikan:

Upaya mendapatkan data tolok ukur kualitatif maupun kuantitatif, memerlukan aneka ragam pengamatan langsung terhadap perubahan yang terjadi pada hewan uji. Ketaatan terhadap tata cara baku pengamatan maupun pengambilan cuplikan untuk masing-masing jenis uji toksikologi, merupakan suatu keharusan.

5. Faktor analisis hasil, evaluasi hasil, dan penarikan kesimpulan:

Segala sesuatu yang dilakukan berkaitan dengan uji toksikologi harus dikerjakan dengan seksama sesuai dengan kriteria baku dan tujuan masing-masing uji toksikologi sehingga kesahihan uji tersebut dapat dipertanggungjawabkan.

MODUL III
Uji Ketoksikan Akut
(Uji Ketoksikan Akut Parasetamol)

3.1. CAPAIAN PEMBELAJARAN MATA KULIAH

Mahasiswa mampu memahami tujuan, sasaran, tata cara pelaksanaan dan manfaat uji ketoksikan akut suatu obat

3.2. DASAR TEORI

Ketoksikan akut adalah derajat efek toksik sesuatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat setelah pemberiannya dalam dosis tunggal. Batasan waktu singkat disini ialah rentang waktu selama 24 jam setelah pemberian senyawa. Tujuan utama ketoksikan akut sesuatu obat ialah untuk menetapkan potensi ketoksikan akut/LD50 yakni kisaran dosis letal atau dosis toksik obat terkait, pada satu hewan uji atau lebih. Data yang dikumpulkan berupa toksik obat terkait, pada satu hewan uji atau lebih. Data yang dikumpulkan berupa tolak ukur ketoksikan kuantitatif (kisaran dosis letal atau toksik) dan tolak ukur ketoksikan kualitatif (gejala klinis, wujud, dan mekanisme efek toksik).

Dosis letal LD50/ dosis toksik TD50 yaitu suatu besaran yang diturunkan secara statistik, guna menyatakan dosis tunggal sesuatu senyawa yang diperkirakan dapat mematikan atau menimbulkan efek toksik yang berarti 50% hewan uji. Untuk menghitung LD50 ada metode 3 metode yaitu metode grafik Litchfield & Wilcoxon, metode kertas grafik probit logaritma Miller dan Tainter, dan metode rata-rata bergerak Thompson Well.

3.3. PROSEDUR KERJA

1. Pemilihan hewan uji: digunakan 2-4 jenis hewan uji, terdiri dari rodent (tikus atau mencit) dan nonrodent (kelinci), baik

jantan maupun betina, satu galur, dewasa sehat dan beratnya seragam (variasi yang diperbolehkan lebih kurang 10%).

2. Pengelompokan hewan uji:

Sejumlah hewan uji yang terpilih diadaptasikan di laboratorium selama 1 minggu. Penimbangan berat badan dilakukan 1 hari sebelum perlakuan. Kemudian hewan uji dibagi menjadi beberapa kelompok sesuai dengan peringkat dosis senyawa uji yang akan diberikan, ditambah dengan 1 kelompok kontrol negatif. Masing-masing kelompok uji paling sedikit terdiri dari 5 ekor hewan uji.

3. Tata cara pemberian/pemejanaan dosis sediaan uji:

Senyawa uji sedapat mungkin disiapkan dalam bentuk larutan. Dosisnya minimal dibuat 4 peringkat dosis, mulai tertinggi sampai terendah yang mengakibatkan kematian 10-90% kematian hewan pada masa akhir. Peringkat dosis merupakan interval logaritams dengan kelipatan yang tetap seyogyanya dengan kelipatan tetap=4. Untuk obat tradisional lebih baik dicoba dahulu tertinggi tepat pada batas volume maksimum yang boleh diberikan hewan uji.

4. Analisis dan evaluasi hasil:

- Data klinis nampak pada fungsi vital, dipakai untuk mengevaluasi mekanisme penyebab kematian
- Data hasil pemeriksaan histopatologis digunakan untuk mengevaluasi spektrum efek toksik
- Data jumlah hewan yang mati pada masing-masing kelompok secara kuantitatif digunakan untuk menghitung harga LD50

Dari harga LD50 yang diperoleh selanjutnya potensi ketoksikan akut senyawa uji dapat digolongkan menjadi:

Sangat tinggi	: LD50<1mg/kg
Tinggi	: LD50 1-50mg/kg
Sedang	: LD50 50-500mg/kg
Sedikit toksik	: LD50 50-500mg/kg

Sedikit toksik : LD50 500-5000mg/kg
 Hampir tidak toksik : LD50 5-15 g/kg
 Relatif tidak berbahaya : LD50 > 15g/kg

Tabel pemeriksaan fisik dalam uji ketoksikan akut pada rodent

Sistem Organ	Pengamatan dan Pemeriksaan	Tanda-Tanda Umum Ketoksikan
SSP & Somatomotor	Perilaku	Perubahan sikap terhadap pengamat, vokalisasi luar biasa, gelisah
	Gerakan	Kedutan, tremor, ataksia, katatonia, paralysis, konvulsi, keterpaksaan gerak
	Kereaktifan terhadap aneka rangsang	Keberangasan, kepekaan, anesthesia, anesthesia, hiperastesia
	Reflek serebral & spinal	Lemah, tidak ada
	Tonus otot	Kekakuan, kelembekan
Sistem saraf otonom	Ukuran pupil	Miosis, midriasis
	Sekresi	Saliva, lakrimasi
Pernafasan	Sifat dan laju nafas	Bradipnea, dispnea
Kardiovaskular	Palpitasi daerah kardiak	Bradikardia, aritmia, denyut lebih kuat atau lemah
Saluran cerna	Peristiwa perut	Diare, sembelit, flatulen, kontraksi

	Konsistensi tinja	Tidak terbentuk, warna hitam
Genitourinari	Vulva, kelenjar mammae	Bengkak
	Penis	Prolap
	Daerah perineal	Kotor
Kulit dan bulu	Warna, keutuhan	Kelembekan, kemerahan, pelepasan, piloereksi
Membran mukosa	Konjungtiva, mulut	Kongesti, perdarahan, sianosis, kekuningan
Mata	Kelopak mata	Ptosis
	Bola mata	Exophthalmos, nistagmus
	Transparansi	Opositas
Lain-lain	Tempat injeksi	Bengkak
	Kondisi umum	Perawatan abnormal, kurus

MODUL IV

UJI CHOLINESTERASE

4.1. CAPAIAN PEMBELAJARAN MATA KULIAH

Mahasiswa mampu memahami tujuan, sasaran, tata cara pelaksanaan, dan manfaat uji cholinesterase.

4.2. DASAR TEORI

Enzim cholinesterase sangat penting terutama untuk kerja sistem saraf. Hidrolisis asetilcholin oleh enzim cholinesterase menghasilkan asam asetat dan cholin yang berfungsi sebagai perantara kimia pada sinaps sistem saraf otonom sehingga rangsangan yang sampai dapat diteruskan. Tinggi rendahnya aktivitas enzim cholinesterase menjadi indikator tinggi rendahnya tingkat keracunan. Derajat pengaruh racun pada tubuh seseorang dipengaruhi oleh beberapa factor, antara lain umur; jenis kelamin; derajat kesehatan tubuh; daya tahan; nutrisi; tingkat kelemahan tubuh; faktor genetik; kondisi sinergi bahan kimia; dan status endokrin. Faktor-faktor tersebut dapat menjadi faktor yang memperberat atau mempercepat timbulnya keracunan atau justru sebagai barrier sehingga kasus keracunan tidak sampai terjadi. Ketika seseorang terpapar pestisida golongan organofosfat, cholinesterase akan berikatan dengan pestisida tersebut yang bersifat irreversible. Akibatnya tidak terjadi reaksi dengan asetilcholin secara baik. Dalam pemeriksaan akan nampak terjadinya penurunan aktivitas cholinesterase atau peningkatan kadar asetilcholin. Penurunan aktivitas cholinesterase dalam eritrosit dapat berlangsung hingga 1 – 3 minggu, sedangkan penurunan aktivitas cholinesterase dalam trombosit dapat berlangsung hingga 12 minggu atau 3 bulan (Siswanto, 1991)

4.3. ALAT DAN BAHAN

1. Alat yang diperlukan :

- a. Alat pengambil darah (autoklik, mikropipet/klinipet)
- b. Tabung reaksi
- c. Komparator dan kolinesterase komparator disc.

2. Bahan :

- a. Bromthymol blue (BTB)
- b. Acetylcholine perchlorat (ACP)
- c. Aquades bebas CO₂(Aquabides)
- d. Alkohol 70%

4.4. PROSEDUR KERJA

- a) Pembuatan larutan Achetylcholine perchlorat (ACP). Larutan ini harus selalu dibuat baru karena larutan Achetylcholine perchlorat (ACP) dalam air tidak dapat bertahan lama sehingga harus segera digunakan (terjadi perubahan pH)
- b) Pengambilan sampel darah. Sampel darah diambil dari ujung jari (jari telunjuk, jari tengah atau jari manis) yang ditusuk dengan autoklik; 1) Sebelum ditusuk, sekitar jari dibersihkan dengan alcohol 70% agar bebas kuman; 2) Selanjutnya jari ditusuk dengan autoklik (lancet), tekan jari sampai darah keluar lalu gunakan mikropipet/klinipet untuk menghisap darah sebanyak 0,01 cc
- c) Pemeriksaan sampel

Siapkan tabung reaksi dan isi dengan 0,05 ml larutan BTB : 1) Ambil sampel darah sebanyak 0,01 cc, masukkan dalam tabung reaksi, kocok secara perlahan; 2) Tambahkan larutan ACP sebanyak 0,05 ml ke dalam tabung dan kocok perlahan; 3) Pindahkan isi tabung ke dalam kuvet yang tersedia pada alat komparator. Tempatkan kuvet ini pada ruang sebelah kanan dari komparator dan carilah warna yang sama dengan warna yang ada di dalam disc.; 4) Perhatikan berapa persen aktivitas kolinesterase yang tertera pada

alat komparator dan 5) Selanjutnya buanglah campuran dalam kuvet dan bilas kuvet sampai bersih dan dikeringkan.

Tabel hasil pengamatan

Sampel Darah	Kadar Cholinesterase			
	1	2	3	4

MODUL V

UJI LOGAM BERAT

5.1. CAPAIAN PEMBELAJARAN MATA KULIAH

Mahasiswa mampu memahami tujuan, sasaran, tata cara pelaksanaan dan manfaat uji logam berat.

5.2. DASAR TEORI

Unsur logam berat adalah unsur yang mempunyai densitas lebih dari 5gr/cm^3 (Fardiaz,1992). Hg mempunyai densitas $13,55\text{gr/cm}^3$. Diantara semua unsur logam berat, Hg menduduki urutan pertama dalam hal sifat racunnya, dibandingkan dengan logam berat lainnya, kemudian diikuti oleh logam berat antara lain Cd, Ag, Ni, Pb, As, Cr, Sn, Zn (Waldchuk,1984, didalamFardiaz,1992).

Bahan Berbahaya dan Beracun (B3) adalah setiap bahan yang karena sifat atau konsentrasinya, jumlahnya, baik secara langsung maupun tidak langsung, dapat mencemarkan dan/atau merusakkan lingkungan hidup, kesehatan, kelangsungan hidup manusia serta makhluk hidup lain (Pasal1(17) UU No.231997). B3 dalam ilmu bahan dapat berupa bahan biologis (hidup/mati) atau zat kimia. Zat kimia B3 dapat berupa senyawa logam (anorganik) atau senyawa organik, sehingga dapat diklasifikasikan sebagai B3 biologis, B3 logam dan B3 organik.

Menurut data dari Environmental Protection Agency (EPA) tahun 1997, yang menyusun "top-20" B3 antara lain: Arsenic, Lead, Mercury, Vinylchloride, Benzene, Polychlorinated Biphenyls (PCBs), Kadnium, Benzo(a) pyrene, Benzo(b) fluoranthene, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Chloroform, Aroclor1254, DDT, Aroclor1260, Trichloroethylene, Chromium (hexa valent), Dibenz[a,h]anthracene, Dieldrin, Hexachlorobutadiene, Chlordane. Dari 20 B3 tersebut, diantaranya adalah logam berat, antara lain Arsenic (As), Lead (Pb), Mercury (Hg), Kadnium (Cd) dan Chromium (Cr), (Hamilton, 2003).

5.3. ALAT DAN BAHAN

1. Alat-alat yang digunakan:
 - a. Tabung reaksi
 - b. Pipet ukur 5 ml
 - c. Pipet ukur 1 ml
 - d. Pipet tetes
2. Bahan-bahan yang digunakan :
 - a. Kertas pH universal.
 - b. Larutan Na₂S 10%
 - c. Larutan ammonia, NH₄OH 1 N
 - d. Larutan ditizon 0,005%
 - e. Kalium sianida, KCN
 - f. Kertas test Pb
 - g. Kertas test arsen

5.4. PROSEDUR KERJA

1. Pemeriksaan Merkuri (Hg)
 - a. Ke dalam tabung reaksi dimasukkan 5 ml sampel, ditambahkan 1 ml Na₂S 10%, dikocok dan diamati. Bila terjadi kekeruhan maka larutan ini mengandung logam.
 - b. Ke dalam tabung reaksi dimasukkan 5 ml sampel, atur pH = 4,5 dengan penambahan NH₄OH 1 N, ditambahkan 5 ml larutan ditizon 0,005%, dikocok kuat selama 1 menit, dibiarkan kedua lapisan yang terbentuk memisah, bila lapisan ditizon berwarna merah jingga berarti sampel mengandung merkuri.
2. Pemeriksaan Merkuri menggunakan Merkuri test kit.
 - a. Timbang 25 gram sampel, tumbuk halus lalu tambahkan 50 ml aquades
 - b. Masukkan 5 ml sampel ke dalam tabung reaksi lalu tambahkan reagen Merkuri 1 sebanyak 3 tetes, aduk perlahan
 - c. Siapkan kertas merkuri, lalu teteskan sampel pada perlakuan 2 sebanyak 3 tetes
 - d. Diamkan beberapa saat, apabila terbentuk warna putih kemerah-merahan hingga merah kebiruan maka sampel positif mengandung merkuri
3. Pemeriksaan Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd)

- a. Ke dalam tabung reaksi dimasukkan 5 ml sampel, ditambahkan 1 ml Na₂S 10%, dikocok dan diamati. Bila terjadi kekeruhan larutan ini mengandung logam
 - b. Ke dalam tabung reaksi dimasukkan 5 mL sampel, atur pH = 8,5 dengan penambahan NH₄OH 1 N, ditambahkan 5 mL larutan ditizon 0,005%, dikocok kuat, dibiarkan kedua lapisan yang terbentuk memisah, bila lapisan ditizon berwarna merah muda berarti sampel mengandung cadmium (Cd)
 - c. Ke dalam tabung reaksi dimasukkan 5 mL sampel, atur pH = 8,5 dengan penambahan NH₄OH 1 N, dimasukkan Kristal KCN, ditambahkan 5 mL larutan ditizon 0,005%, dikocok kuat, dibiarkan kedua lapisan yang terbentuk memisah, bila lapisan ditizon berwarna merah tua berarti sampel mengandung timbal (Pb).
4. Pemeriksaan Timbal (test kit)
- a. Masukkan 5 ml sampel ke dalam tabung reaksi, cek pH-nya
 - b. Jika pH ≠ 2 – 5, tambahkan 3 tetes reagen Pb 1. Cek kembali pHnya
 - c. Celupkan kertas Pb test selama 1 detik lalu dianginkan beberapa saat (2 menit). Cocokkan warna yang terbentuk dengan warna standar Pb
5. Pemeriksaan Arsen (As)
- a. Siapkan 2 kuvet khusus untuk pemeriksaan Arsen,
 - b. Kuvet 1 diisi dengan 10 ml sampel, kuvet 2 diisi dengan 5 ml sampel
 - c. Masing-masing kuvet diberi 1 cup reagen Arsen 1, kocok perlahan.
 - d. Tambahkan reagen Arsen 2 ke dalam kuvet 1 sebanyak 2 cup dan 1 cup ke dalam kuvet 2, kocok perlahan.
 - e. Masukkan kertas Arsen melalui tutup kuvet, lalu jepitkan pada penjepit di tutup kuvet
 - f. Kocok perlahan selama 20 menit
 - g. Setelah 20 menit tarik kertas Arsen lalu celupkan ke aquades dan dianginkan sebentar. Bandingkan warna yang terbentuk pada deret warna.

Tabel hasil pengamatan

Nomor sampel	Kadar Hg	Kadar Cd	Kadar Pb	Kadar Arsen	Keterangan