

Uji-uji Toksikologi

Blok 6

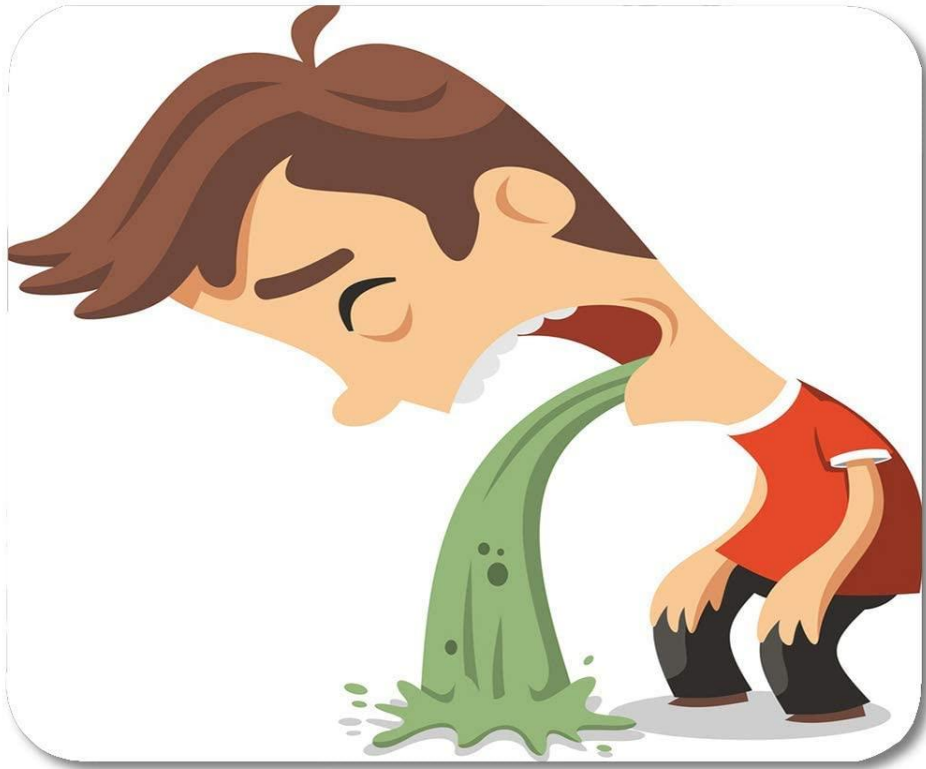
Prodi Farmasi FKIK UMY

Juni 2023

Apa yang dipelajari?

- Uji- Uji Toksikologi :
 - a) Konsep penelitian
 - b) Takrif dan makna
 - c) Sistem uji toksikologi
 - d) Penentu kesahihan uji toksikologi
 - e) Jenis uji ketoksikan
 - f) Evaluasi keamanan
 - g) Penilaian Resiko

Apa yang anda pikirkan?



Amazon.co.uk



shutterstock.com · 572215345

- Setiap obat/makanan yang akan diproduksi dan dipasarkan untuk dikonsumsi manusia harus memenuhi persyaratan keamanan.
- Untuk memenuhi persyaratan keamanan harus melalui serangkaian uji toksikologi



Asas Umum Uji Toksikologi

- Asas umum uji toksikologi :
 - Jenis uji toksikologi
 - Evaluasi keamanan
 - Penilaian risiko

Penggolongan Toksisitas

- 1. Toksisitas Akut – efek yang langsung berhubungan dengan pemaparan zat toksik.
- 2. Toksisitas Kronis – efek yang diterima tubuh karena adanya zat toksik dalam jumlah sedikit, dalam jangka waktu lama → terakumulasi mencapai konsentasi toksik dan menyebabkan gejala keracunan



Toksisitas
Sub Kronik

Uji Toksisitas



Cognibrain.com

- Uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data pada dosis tertentu yang khas dari zat uji
- Tujuan akhir dari uji toksikologik dan penelitian lainnya yang berkaitan dalam menilai keamanan/resiko toksikan pada manusia, idealnya data dikumpulkan dari manusia → hambatan etik
- Uji toksikologik umumnya dilakukan pada binatang, hewan bersel tunggal, atau sel kultur.
- Dari data-data tersebut dilakukan ekstrapolasi ke manusia, sehingga diperoleh batasan-batasan nilai yang dapat diterapkan pada manusia
- Disamping itu informasi tertentu mengenai efek zat kimia pada manusia dapat diperoleh lewat berbagai cara, seperti: surveilans medis pekerja yang terpejan pada zat kimia tertentu, penelitian epidemiologi pada segmen masyarakat tertentu dan penelitian klinik pada pasien yang diberi dosis berlebihan disamping pasien yang secara kebetulan atau dengan sengaja terpejan pada sejumlah besar toksikan.

Perhatian pada uji toksisitas

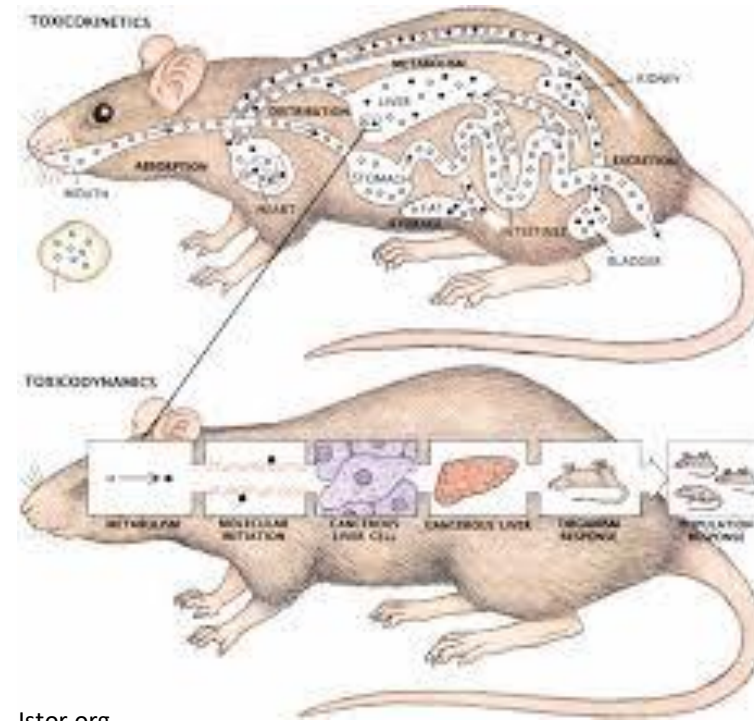
1. Pemilihan spesies, galur, dan jumlah hewan uji
2. Cara pemberian zat uji
3. Pemilihan dosis pengujian
4. Sifat fisika dan kimia zat uji
5. Efek samping zat uji dan kespesifikan organ tertentu
6. Teknik dan prosedur pengujian

Uji toksisitas : in Vitro in Vivo



openpr.com

A



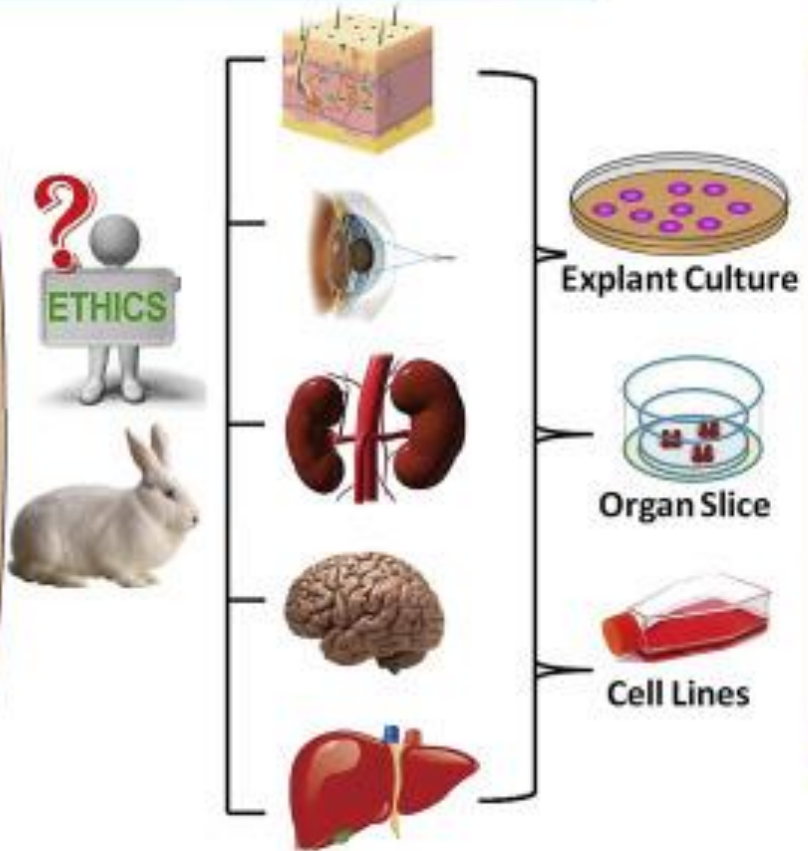
Jstor.org

B

Principles of In Vitro Toxicology

Selection of appropriate model system for in vitro toxicity assessment

Replace animal studies by other methods



Optimization of cell culture.
↓
Selection of assay for toxicity evaluation.
↓
Development of biomarkers for in vitro toxicity evaluation.
↓
Dose response relationship.
↓
Data interpretation
↓
Validation of in vitro test methods

Uji toksisitas adalah suatu uji untuk menentukan:

(a) potensial suatu senyawa sebagai racun,

(b) mengenali kondisi biologis/lingkungan munculnya efek toksik, dan

(c) mengkarakterisasi aksi/efek

Prinsip uji toksikologi meliputi (I Made, 2006):

1. Ada persamaan sistem biokimia pada spesies hewan uji dan mekanisme sistem biologi mamalia.
2. Substansi uji dapat menyebabkan disfungsi dan kerusakan jaringan pada beberapa dosis pemaparan.
3. Data toksikologi dari hewan coba dapat digunakan untuk mengukur dosis yang tidak menyebabkan efek negatif pada manusia.
4. Hubungan antara konsentrasi bahan kimia pada lokasi kontak dengan pengaruh yang ditimbulkan adalah hal yang penting untuk diperhatikan

Uji Toksisitas

1. Uji ketoksikan tak khas (Umum)
2. Uji ketoksikan khas (Khusus)




Uji Ketoksikan Umum

- uji toksikologi yg dirancang untuk mengevaluasi keseluruhan atau spektrum efek toksik senyawa pd berbagai hewan uji
 1. Uji toksisitas akut
 2. Uji toksisitas subkronis
 3. Uji toksisitas kronis

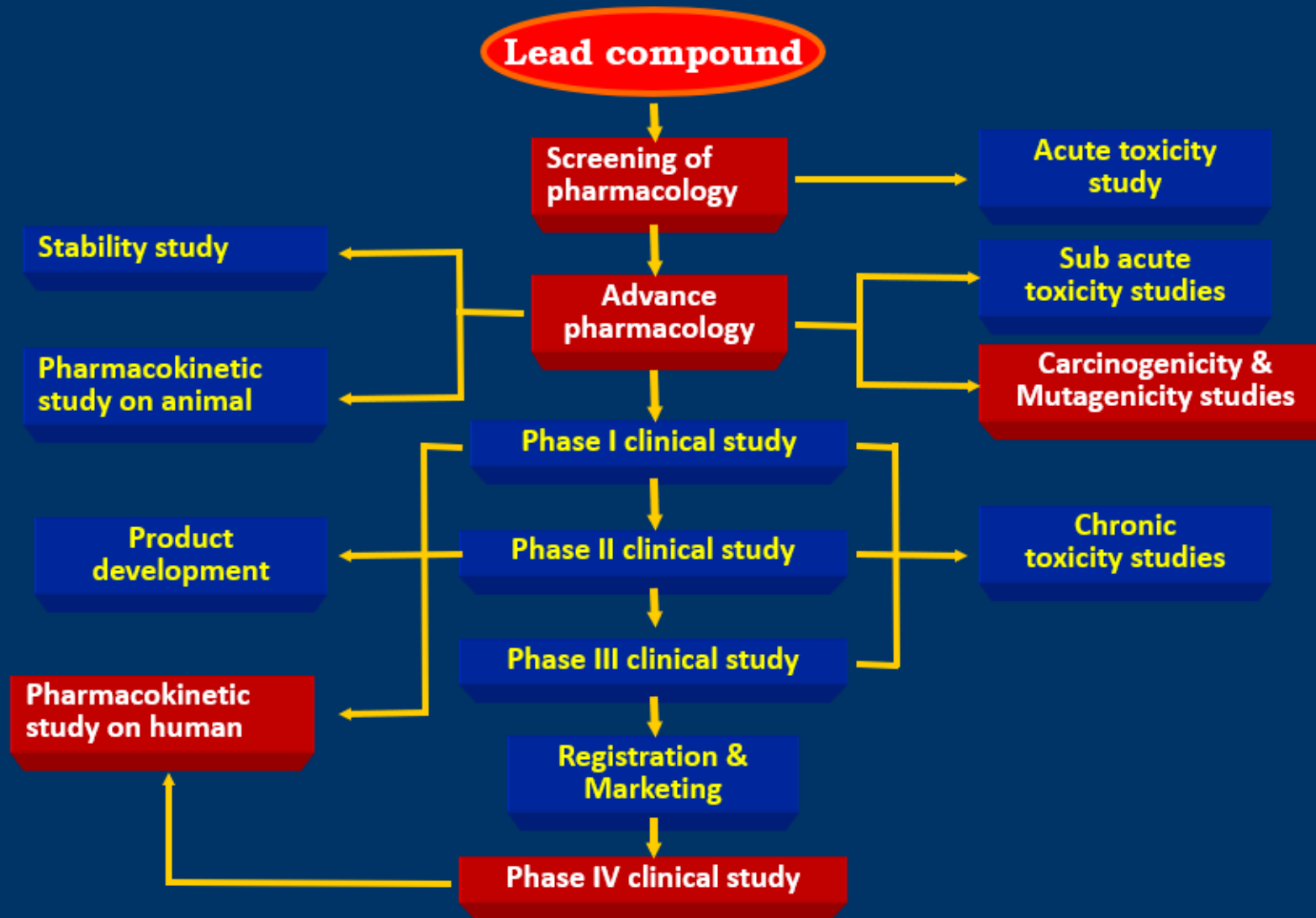
2. Uji ketoksikan khusus:

- uji toksikologi yg dirancang untuk mengevaluasi secara rinci efek khas senyawa pada berbagai hewan uji
 1. Uji potensiasi
 2. Uji karsinogenik
 3. Uji mutagenik
 4. Uji reproduksi
 5. Uji efek toksik pd kulit dan mata
 6. Uji efek toksik pd perilaku

Spektrum Efek Toksik

- 1. efek local dan sistemik
 - 2. efek reversible dan irreversible
 - 3. efek segera dan tertunda
 - 4. efek morfologis, fungsional, dan biokimiawi
 - 5. reaksi alergi dan idiosinkrasi
 - 6. respon bertingkat dan respon kuantal
- 

Peran Uji Toksikologi dalam Pengembangan Obat



Uji Ketoksikan Umum

1. Uji Toksisitas Akut : pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian zat uji dalam dosis tunggal, atau dosis berulang yang diberikan dalam jangka waktu 24 jam
2. Uji Toksisitas Subkronik : suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian zat uji dengan dosis berulang pada hewan uji selama Sebagian umur hewan uji, tetapi tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan uji
3. Uji Toksisitas kronik: pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian zat uji secara berulang sampai seluruh umur hewan

Uji toksisitas akut

- Tujuan : untuk menentukan efek toksik senyawa yg dalam waktu singkat setelah pemejanaan dosis tertentu, mendeteksi toksisitas intrinsic suatu zat, menentukan organ sasaran dan kepekaan species, memperoleh informasi bahaya setelah pemaparan suatu senyawa secara akut, memperoleh informasi awal untuk tingkat dosis, menetapkan LD50, dan merancang uji toksisitas berikutnya, skrining pertama untuk mutagenisitas
- Metode : memberikan dosis tunggal pada paling tidak 2 hewan uji roden dan nonroden
- Dosis : 4 peringkat dosis, dosis terendah tidak/hampir tidak mematikan hewan uji & dosis tertinggi mematikan seluruh/hampir seluruhnya

Uji Toksisitas Akut

- Prinsip uji: Zat uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan pada beberapa kelompok hewan uji, satu dosis per kelompok
- Diamati adanya efek toksik dan kematian
- Cara pemberian : jalur yg akan digunakan manusia/memungkinkan terpejani
- Pengamatan : 24 jam, dilanjutkan 7-14 hari
 - Gejala klinis, Jumlah hewan mati, Histopatologi
- Informasi yg diperoleh : data kuantitatif (LD_{50}), data kualitatif penampakan klinis dan morfologis
- Manfaat : LD_{50} untuk menentukan potensi efek toksik dan takaran dosis uji selanjutnya

Uji Ketoksikan Umum- Uji Toksisitas akut

- Gejala keracunan yang muncul sesudah 24 jam menunjukkan bahwa bahan obat atau bahan itu mempunyai titik tangkap kerja pada tingkat yang lebih bawah sehingga gejala keracunan dan kematian seolah-olah tertunda (*delayed toxicity*). Oleh karena itu banyak ahli berpendapat bahwa gejala keracunan perlu diamati sampai 7 hari (Ngatidjan, 1997), bahkan juga sampai 2 minggu (Paget, 1970).

PROSEDUR UJI TOKSISITAS AKUT

– Kondisi ruangan dan pemeliharaan hewan uji

Untuk hewan pengerat digunakan ruangan dengan suhu 22°C ($\pm 3^\circ$), kelembaban relatif 30-70%, dan penerangan 12 jam terang dan 12 jam gelap.

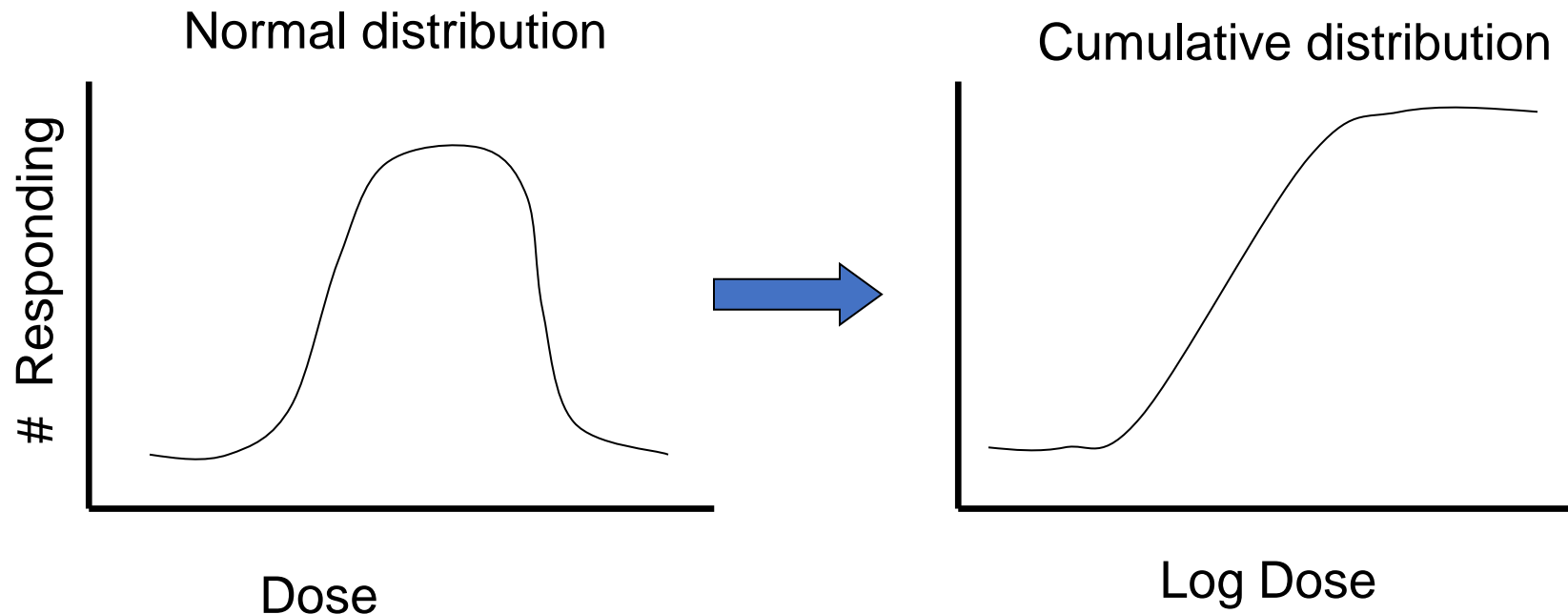
– Dosis dan batas uji

Digunakan 5 – 10 kelompok dosis dan 1 kelompok kontrol. Dosis uji dengan dosis tertinggi yang menyebabkan 0% kematian dan dosis terendah yang menyebabkan 100% kematian. Batas uji 15.000 mg/kg BB tidak perlu dinaikan lagi.

https://www.youtube.com/watch?v=L_NXal2tswo

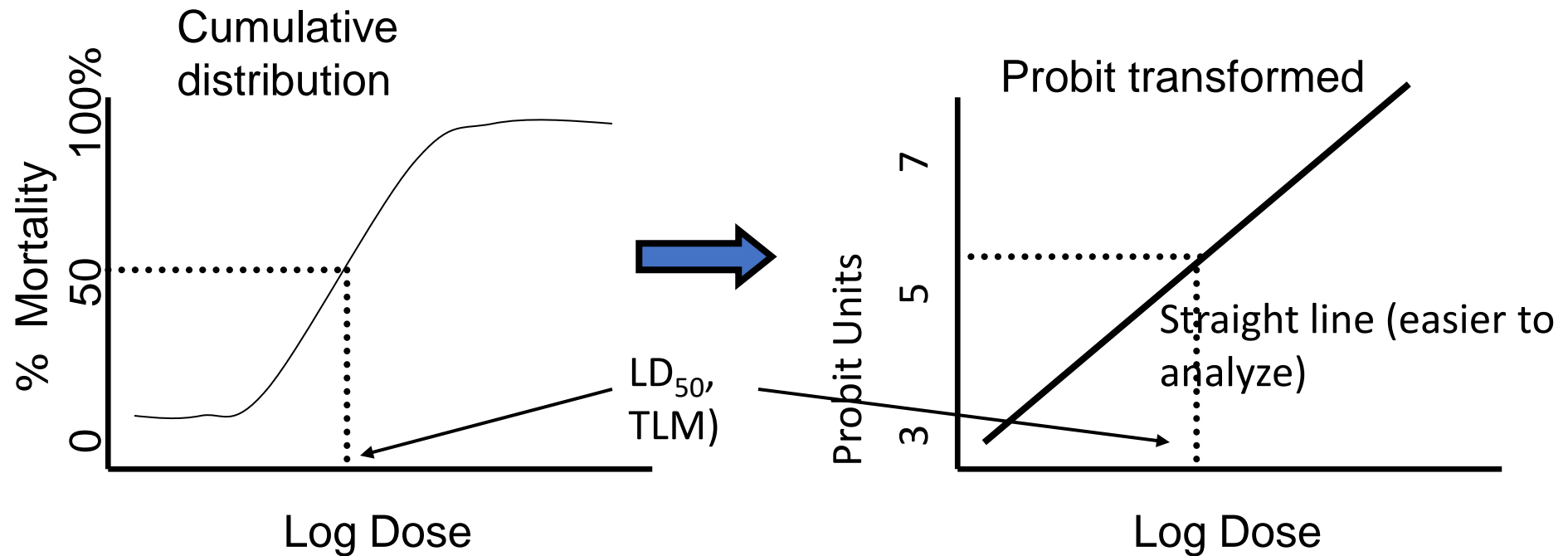
Probit Analysis

- Respons organisms terhadap efek toksik senyawa diasumsikan berbentuk distribusi normal
- Tidak dapat dihitung dari distribusi normal secara langsung karena efeknya merupakan efek kumulatif sehingga harus dibuat distribusi kumulatif.



Converting a curvilinear line to straight line

- **Sulit mengevaluasi dg garis kurva**
- **Konversi ke garis lurus lebih mudah menghitungnya**




Evaluasi Pengamatan Toksisitas Akut

- Parameter uji perilaku
- Pengamatan bobot badan
- Indeks organ
- $\% \text{ bobot organ} = \text{bobot organ} / \text{bobot badan} \times 100\%$
- Kematian
- Penemuan maskroskopis dan mikroskopis

LD50 : dosis tunggal suatu zat yg secara statistic membunuh 50% hewan percobaan

MANFAAT :


1. Klasifikasi zat kimia sesuai dengan toksisitas relatifnya
 2. Evaluasi dampak keracunan yang tidak disengaja
 3. Perencanaan toksisitas subkronik dan kronik
 4. Memberikan informasi dalam merencanakan pengujian obat pada manusia
 5. Memberikan informasi tentang mekanisme toksisitas, pengaruh umur, jenis kelamin, variasi respon antar species/hewan
 6. Deteksi pencemaran toksik dan perubahan fisik yang mempengaruhi bioavailabilitas
- 

NILAI LD50

Kategori	LD50
supertoksik	5 mg/kg atau kurang
Amat sangat toksik	5 - 50 mg/kg
Sangat toksik	5 - 500 mg/kg
Toksik sedang	0,5 – 5 g/kg
Toksik ringan	5 – 15 g/kg
Praktis tidak toksik	> 15 g/kg

Uji Toksisitas Sub Kronik- bentuk skrining kedua atas indikasi dampak toksisitas

Tujuan :

- Uji toksisitas dosis berulang selama <3 bulan (30 s/d 90 hari)
 - Mengungkap spektrum efek toksik dan apakah efek toksik berkaitan dg takaran dan dosis
 - Skrining kedua terhadap mutagenisitas
 - Uji Farmakokinetika
 - Uji Perilaku
 - Uji Interaksi (sinergisme, antagonism)
- 

Uji toksisitas sub kronik

- Metode :
 - 1 jenis hewan dewasa sehat jantan dan betina
 - Pemilihan hewan didasarkan pd uji toksisitas akut atau uji metabolit
 - Hewan uji peka dan mirip dg manusia
 - Jumlah 10 ekor setiap jenis kelamin dan dosis

Uji toksisitas sub kronik

- Dosis & Cara pemberian:
 - Minimal 3 peringkat dosis, 1 dosis memperlihatkan efek toksik yg nyata dan 1 dosis lain sama sekali tidak menimbulkan efek toksik
 - Dosis sekali/hari selama uji berlangsung dg jalur yg sesuai masuknya pada manusia
 - Lama pemberian zat uji selama 28 – 90 hari atau 10% dari seluruh umur hewan uji

Uji toksisitas sub kronik

- Pengamatan :
 1. Perubahan BB/7 hari (minimal)
 2. Masukan makanan dan minuman/7 hari minimal
 3. Gejala klinis umum yg dapat diamati/hari
 4. Pemeriksaan hematologi, minimal 2 kali, awal & akhir
 5. Pemeriksaan kimia darah sama minimal 2 kali : awal dan akhir
 6. Analisis urin minimal satu kali
 7. Pemeriksaan histopatologi organ pd akhir uji

Uji toksisitas sub kronik

- Informasi yg diperoleh :
 - Efek toksik pd organ-organ sasaran
 - Efek toksik lambat yg tidak teramati pd uji toksisitas akut
 - Hubungan kadar dg efek toksik & reversibilitas efek toksik
- Manfaat :
 - Merancang uji toksisitas kronis

Tujuan Uji Toksisitas Sub kronik

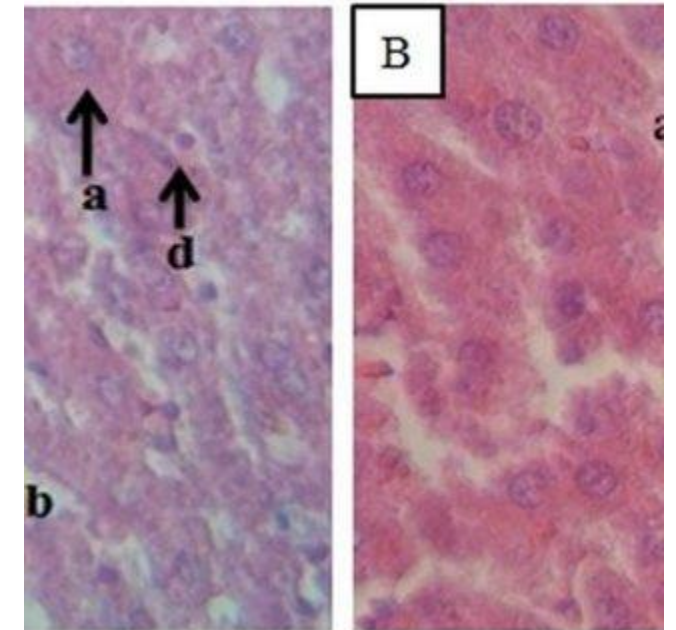
- Mendapatkan informasi tentang efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut
- Mendapatkan informasi adanya efek toksik setelah pemaparan zat kimia secara berulang dalam jangka waktu tertentu
- Mendapatkan informasi dosis yang tidak menimbulkan efek toksik
- Mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas

Evaluasi Uji toksisitas subkronik



scientistlive.com

- Parameter **hematologi** : eritrosit, leukosit, platelet, hematokrit, hemoglobin, diferensiasi leukosit, MCV, MCH, MCHC.
- Parameter **urin** : pH, bobot jenis, volume urin dan endapan.
- Parameter **biokimia darah** : Protein total, kreatinin, nitrogen urea, glukosa, kolesterol, SGPT, SGOT,dll.
- Parameter **uji perilaku**
- Parameter **bobot badan**
- **Histologi** : jantung, paru-paru, hati, ginjal dan limfa. →



Researchgate.com

contoh

Organ/sistem organ	Pengamatan Umum	Uji Laboratorium klinik pada darah	Pemeriksaan patologi
hati	Perubahan warna	SGOT, SGPT, kolesterol, protein total, albumin	Hati
Sistem saluran cerna	Diare, muntah, tinja, nafsu makan	Protein total, albumin, natrium, kalium, globulin	Lambung, saluran cerna
Sistem pernapasan	Frekuensi napas, batuk	Protein total, albumin, globulin	Paru dengan bronkus besar
Sistem endokrin	Kulit, bulu, berat badan, sifat urin dan tinja	Glukosa, Na, K, kolesterol	Tiroid, adrenal, pancreas
kardiovaskuler	Frekuensi dan sifat nadi	SGOT	Jantung

Uji Toksisitas Kronik

- Pendahuluan :
 - Sama dg uji toksisitas subkronik, yg membedakan lama pemberian/takaran dosis, masa pengamatan dan pemeriksaannya
 - Uji toksisitas kronis akan menutupi kelemahan uji toksisitas akut dan subakut
 - Kedua uji tersebut mempunyai keterbatasan pd nilai prediktif hasil ujinya, karena:
 - Efek toksik kemungkinan berbeda bila diberikan berulang dg waktu panjang
 - Selama proses menua, kepekaan jaringan, perubahan kemampuan metabolisme, kondisi fisiologi & patologis bisa merubah efek toksik
 - Uji toksisitas kronis memiliki nilai prediktif lebih representatif dr toksisitas akut dan sub akut

Uji Toksisitas Kronik

- Pemaparan/pembedahan jangka waktu Panjang, melebihi separuh usia hidup hewan uji,
- Tahunan
- Konsentrasi/dosis rendah

- Tujuan Uji :
 - Mutagenesis (Pada mamalia)
 - Karsinogenesitas
 - Farmakokinetika (pada manusia)
 - Klinis (pada manusia)
 - Data Epidemiologis

Uji Toksisitas Kronik

- Tujuan :
 - Menegaskan nilai KETT untuk menentukan masukan harian yg dapat diterim (MHDD)
 - Toleransi zat kimia dalam makanan atau air
 - Batas keamanan suatu senyawa

UJI KETOKSIKAN KHUSUS



Uji potensiasi

- Tujuan : untuk menentukan efek toksik senyawa dengan adanya senyawa lain yg mungkin akan meningkatkan efek toksik senyawa tersebut
- Metode :
 - Sama dg uji toksisitas akut, hanya menggunakan lebih dari 1 senyawa
 - Dibandingkan LD₅₀ senyawa tunggal dg LD₅₀ adanya senyawa lain

Uji kemutagenikan

- Tujuan : untuk menentukan pengaruh senyawa terhadap sistem kode genetik (mutagen).
- Metode :
 - *Uji in vitro* : dilakukan pada bakteri.
 - Memungkinkan analisis rinci komposisi genetiknya
 - Dapat ditambahkan homogenat sistem pemetabolisme
 - Jenis dan tipe kerusakan genetik dapat dideteksi

- *Uji in vivo* : dilakukan dg 3 cara.
 1. Penetapan letal dominan (*the dominant lethal assay*)
 2. Penetapan inang penengah (*the host-mediated assay*)
 3. Sitogenetika *in vivo* (*in vivo cytogenetics*)

Uji Kemutagenikan → Penetapan letal dominan

- Subjek : mencit atau tikus jantan
- Metode :
 - Subjek jantan diberi senyawa $1/5$ LD50
 - Dikawinkan dg subjek betina dan setelah bunting hari ke 14 dikorbankan
 - Dihitung : jumlah korpus lutea, kematian janin awal, kematian janin akhir serta implementasi total
 - IM : $\text{kematian janin awal/implan total} \times 100$
 - Untuk menentukan perubahan kromosom

Uji Kemutagenikan → Penetapan inang menengah

- Digunakan bakteri sbg indikator kerusakan atau perubahan genetik di dalam suatu subjek.
- Memperhitungkan metabolisme mutagen yg potensial dalam diri mamalia inangnya.
- Bakteri indikator *Salmonella* sp & *Neurospora* sp
- Subjek uji: tikus, hamster dan mencit

Uji Kemutagenikan → Sitogenetika in vivo

- Subjek uji: sungsum tulang hewan coba
- Metode :
 - Senyawa diberikan hewan coba kemudian selang beberapa saat dikorbankan dan dilakukan pemeriksaan terhadap sungsum tulang.

Uji kekarsinogenikan: kemampuan zat untuk menimbulkan tumor/kanker

- Uji jangka panjang : memberikan senyawa uji pd hewan uji selama hidupnya. Selama kurun waktu penelitian diamati perkembangannya dan diakhir penelitian diperiksa histologinya.
- *Metode :*
 - Perlu diperhatikan pemilihan hewan uji, dosis, kelompok perlakuan, pengamatan selama uji berlangsung
 - Hewan uji: roden, mencit, tikus, hamster
 - Umur hewan 7-9 bln, uji selama 2 thn untuk tikus, 18 bln untuk mencit

- Uji jangka pendek (*rapid screening test*) : dasarnya adalah interaksi antara karsinogen/ metabolitnya dan makromolekul sel, rangsangan penyimpangan kromosom, mutagenesis, perbaikan DNA, pengikatan DNA
- *Jenis-jenis uji* :
 - Pengaktifan metabolit
 - Reaksi DNA
 - Perbaikan DNA
 - Transformasi neoplastik mamalia *in vitro*
 - Kemutagenikan,
 - Sistem penetapan submamalia
 - Sel somatik mamalia
 - Penetapan inang dan jaringan penengah

Uji keteratogenikan

- Tujuan : untuk menentukan pengaruh senyawa terhadap janin dalam hewan bunting
- Metode :
 - Paling tidak menggunakan 2 hewan coba rodent dan nonrodent
 - Perlu diperhatikan: umur, BB, daur estrus (perubahan fisiologis pd betina), kerentanan hewan thd teratogen
 - Cara : induksi kebuntingan, tegaskan masa kebuntingan, berikan senyawa uji pd masa organogenesis, pemeriksaan keteratogenikan pd akhir uji
 - Perlu diperhatikan peringkat dosis, frekuensi, saat pemberian dan pengamatan.

Rangkaian Uji Teratogenik

1. Menimbulkan kehamilan
2. Memastikan kehamilan dan memberikan zat kimia uji
3. Menentukan efek teratogenic



Mekanisme teratogenik

- Mutasi
- Kelainan kromosom
- Kekurangan nutrisi
- Gangguan pembelahan sel
- Gangguan fungsi asam nukleat
- Perubahan enzim dan biokimiawi sel

Uji Reproduksi

- Tujuan :
 - untuk menentukan pengaruh senyawa terhadap kapasitas reproduksi hewan uji
 - Senyawa kimia bisa toksik pd ovulasi, konsepsi, implantasi, lama bunting, pertumbuhan embrio, partus, laktasi, pertumbuhan pasca lahir
- Metode :
 - Umumnya digunakan tikus, 2-3 generasi
 - Senyawa diberikan pd jantan & betina sebelum dikawinkan

Uji Reproduksi (lanjutan.)

- Metode :
 - Senyawa diberikan lagi selama masa bunting dan laktasi.
 - Turunannya (2-3 generasi) diberi perlakuan mulai umur sapih-kawin-bunting beranak sampai laktasi
 - Pemeriksaan: indeks fertilitas, lama bunting, angka kelahiran hidup, angka kelahiran mati, angka kelahiran hidup 5 hari-umur sapih, rasio jantan/betina, BB, jenis kelainan cacat, histopatologi.

Uji kulit dan mata– uji toksisitas efek lokal

- Tujuan :
 - untuk melihat efek langsung setempat pada kulit dan mata
 - Efek setempat: iritasi primer, korosi, sensitivitas kutan, fototoksis, fotoalergi.
 - Efek iritasi terbalikan tapi korosi tak terbalikan
 - Sensitisasi kutan dan fotoalergi melalui mekanisme imunogenik
 - Sensitisasi kutan tanpa melibatkan cahaya tapi fotoalergi melibatkan cahaya.

Uji iritasi primer kulit

- Hewan uji biasanya kelinci, marmot atau mencit
- Senyawa dioleskan pd kulit yg sebelumnya dicukur
- Reaksi kulit diamati dan dicatat pada interval waktu tertentu (minimal 3 hari)
- Iritasi jaringan diamati dan dievaluasi dari adanya eritema dan edema

Uji sensitisasi kutan

- Hewan uji biasanya marmot jantan
- Senyawa uji dicampur dg lemak marmut: dioksan: aseton (1:2:7) sebelum dioleskan pd kulit yg dicukur
- Sehari setelah perlakuan, rambut janggut dihilangkan dg barium sulfida
- Kemudian diamati adanya pembengkakan dan pendarahan dibandingkan dg kelompok kontrol

Uji fototoksik dan fotoalergi

- Hewan uji biasanya marmot
- Senyawa uji dilarutkan dg alkohol absolut 2% dan dioleskan pd kulit yg dicukur
- Selanjutnya disinari dg sinar UV
- Perlakuan diulang setiap hari selama 5 hari
- Setiap hari diperiksa adanya eritema dan edema sg indeks iritan dan fototoksik

Uji iritasi mata

- Hewan uji biasanya kelinci
- Senyawa uji dioleskan pd konjunctiva mata sebelah kiri dan sebelah kanan sebagai kontrol
- Perubahan pada mata dan jaringan sekitar diamati dan dicatat setiap interval waktu tertentu (24 jam selama 72 jam)

Uji perilaku : Polah Tingkah Laku Hewan

- Tujuan :
 - untuk mengevaluasi aktivitas lokomotor hewan uji akibat senyawa tertentu
 - Bermanfaat untuk mengetahui efek pd SSP
- Jenis uji :
 - Uji roda berputar
 - Lapangan terbuka
 - Sangkar hewan piaraan
 - Sangkar rumit
 - Uji khas



Ikons.id

Penerapan



Penetapan

Potensi Ketoksikan

Batas Keamanan

LD₅₀

Toksikologi

Farmakologi

Kisaran dosis
pemejanaan

Dosis
ambang
pemejanaan

Indeks
Terapi
LD₅₀/ED₅₀

Slop Kurva

KETT

references

- Kemenkes RI, 2017, Buku ajar toksikologi lingkungan
- I Made Agus, Rury, 2006, Toksikologi Umum, Buku Ajar, Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana
- Dr. Afifah B. Sutjiatmo dan Ita Nur Anisa., S. Si., M. Si., Apt
- Prof Mustofa Universitas Gadjah Mada