

# Perkembangan pengujian toksisitas akut oral

Oleh : Katharina Oginawati<sup>1)</sup> dan Toro Adriantoro <sup>2)</sup>

1) Institut Teknologi Bandung

2) Pusat Penelitian dan Pengembangan Laboratorium Kualitas Lingkungan

# PP 101 tahun 2014

## Pengelolaan Limbah Berbahaya dan Beracun

### ▶ Karakteristik Berbahaya:

- ▶ mudah meledak;
- ▶ mudah menyala;
- ▶ reaktif;
- ▶ infeksius
- ▶ Korosi
- ▶ beracun.

### ▶ Karakteristik Beracun

- ▶ melalui TCLP untuk menentukan Limbah yang diuji memiliki konsentrasi zat pencemar lebih besar dari konsentrasi zat pencemar pada kolom TCLP-A sebagaimana tercantum dalam Lampiran III yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan Pemerintah ini; dan c.
- ▶ karakteristik beracun melalui **Uji Toksikologi LD50** untuk menentukan Limbah yang diuji memiliki nilai Uji Toksikologi LD50 lebih kecil dari atau sama dengan 50 mg/kg (lima puluh miligram per kilogram) berat badan hewan uji.

# Standard Methods

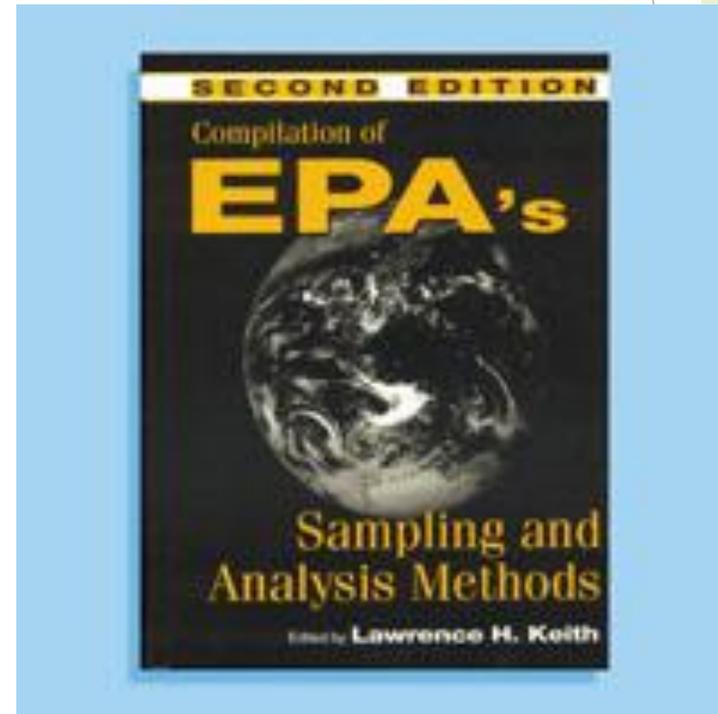
- ▶ Berbagai metoda sudah distandarisasi bahkan tersertifikasi oleh berbagai organisasi
  - ▶ American Society for Testing and Materials (ASTM)
  - ▶ Organization for Economic Cooperation and Materials (OECD) - (Europe based)
  - ▶ National Toxicology Program (NTP)
- ▶ Semua pedoman yang sudah distandarisasi dan di atas tersedia dalam US EPA, sehingga institusi dan peneliti mengembangkan program2 tersebut.

# Keuntungan Standard Methods

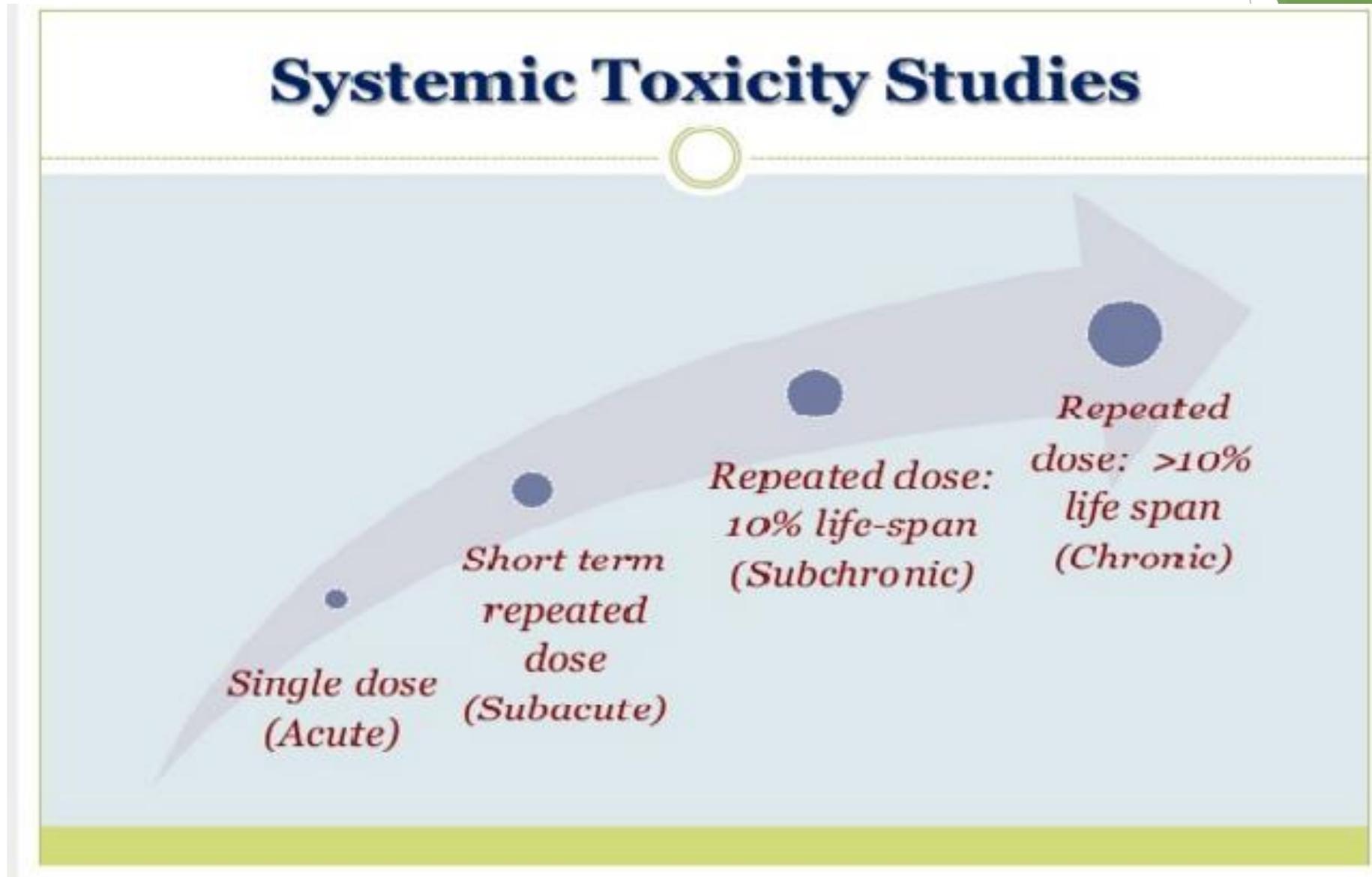
- ▶ Test seragam dan dapat dibandingkan untuk semua laboratorium
- ▶ Dapat diterapkan pada berbagai laboratorium
- ▶ Memudahkan pengambil keputusan untuk memperoleh hasilnya
- ▶ Sangat sederhana dan dapat dikembangkan
- ▶ Metoda standar dan mejadi dasar bila diperlukan dapat dilakukan modifikasi
- ▶ Data yang diperoleh dapat digunakan dalam QSAR, ERA's

# Keuntungan Standard Methods (lanjutan)

- ▶ Peralatan, air pengencer, material test dan hewan uji dan lain-lain disebutkan secara rinci.
- ▶ Percobaan dan analisis juta prosedur disebutkan secara rinci.
- ▶ Terdapat Kriteria ketidakpastian



# Jenis sistem pengujian toksikologi

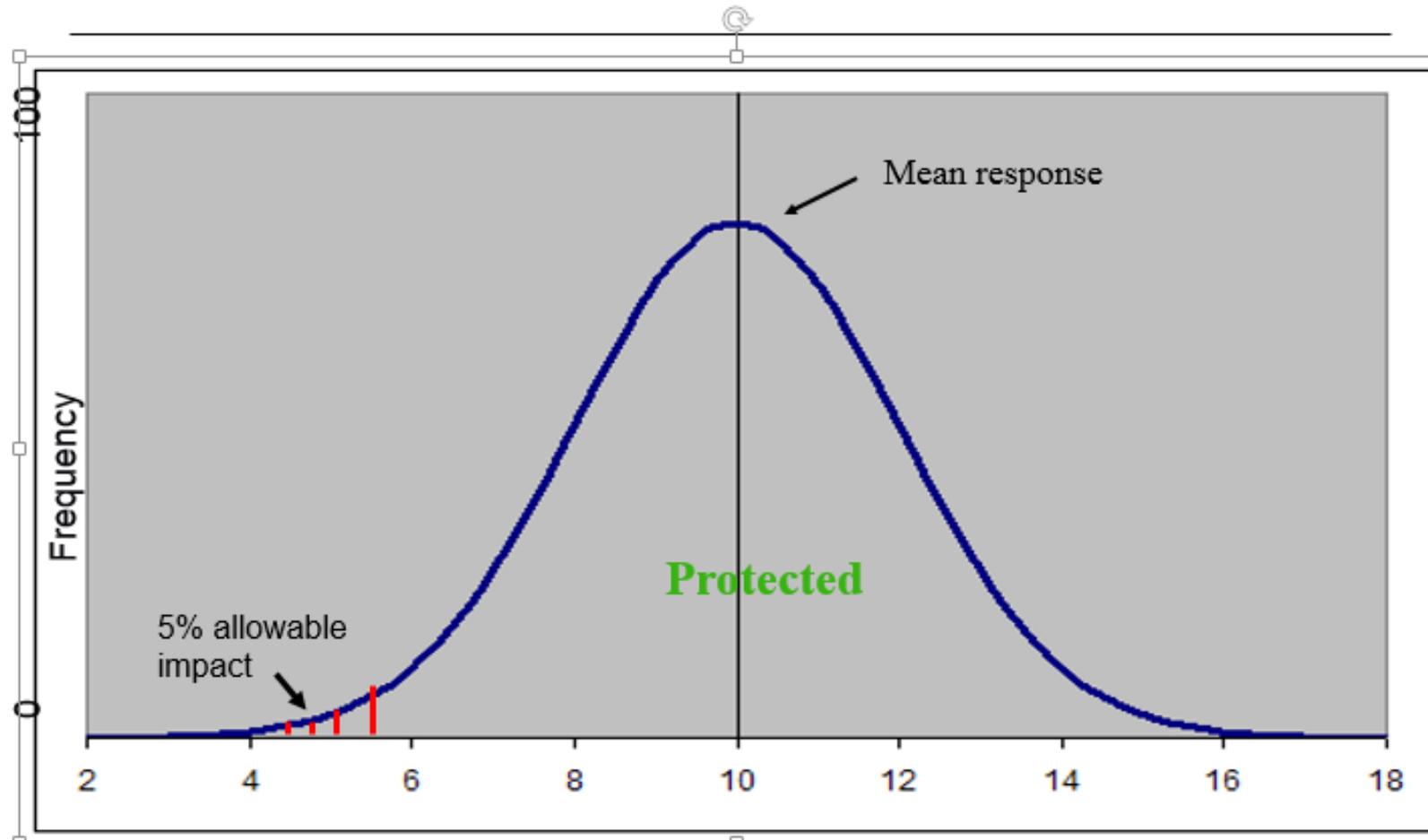


# Pengertian hubungan pengujian toksisitas akut dan nilai LD50

- ▶ Pengujian akut terhadap bahan kimia/ sampel uji dikatakan selesai sebagai LD50 bila dihasilkannya nilai kematian dari bahan kimia tertentu yang diperoleh dari perhitungan secara statistik dari pengujian tunggal terhadap suatu bahan kimia yang menyebabkan kematian 50% dari hewan uji pada kelompok eksperimen pengujian

# Pendekatan probit sebagai penjelasan atas kurva dosis-respon terhadap pengujian toksisitas

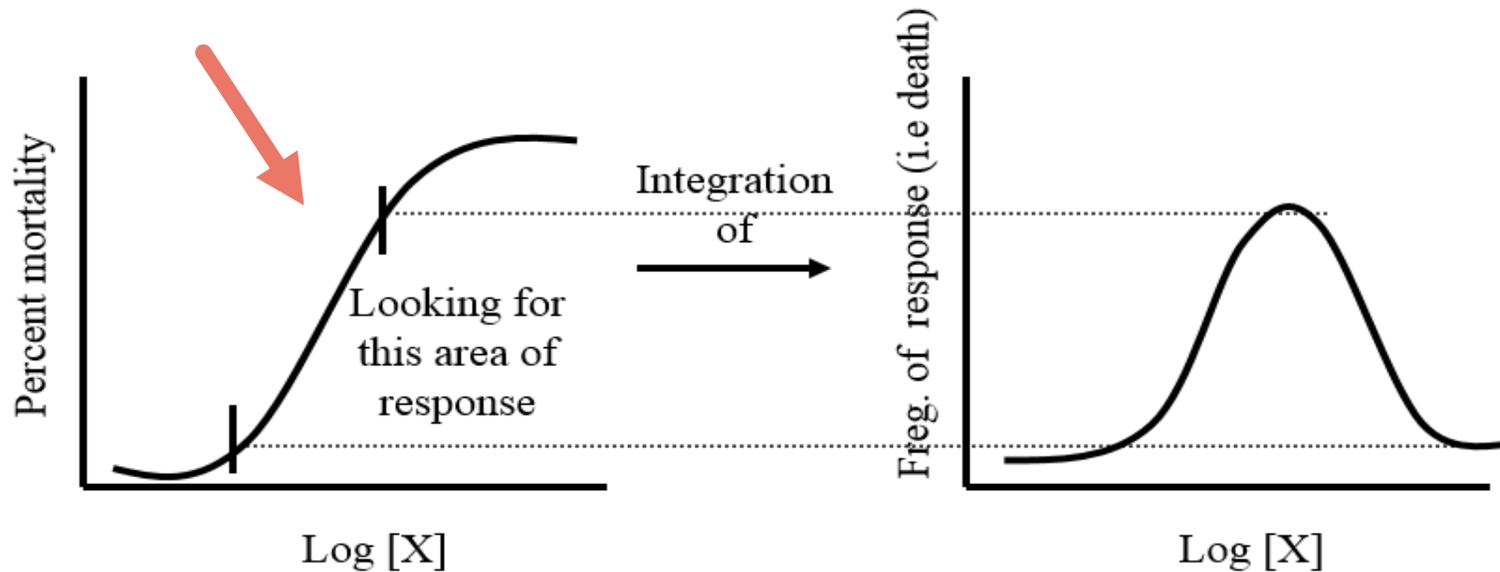
## Normal distribution of resistance/sensitivity



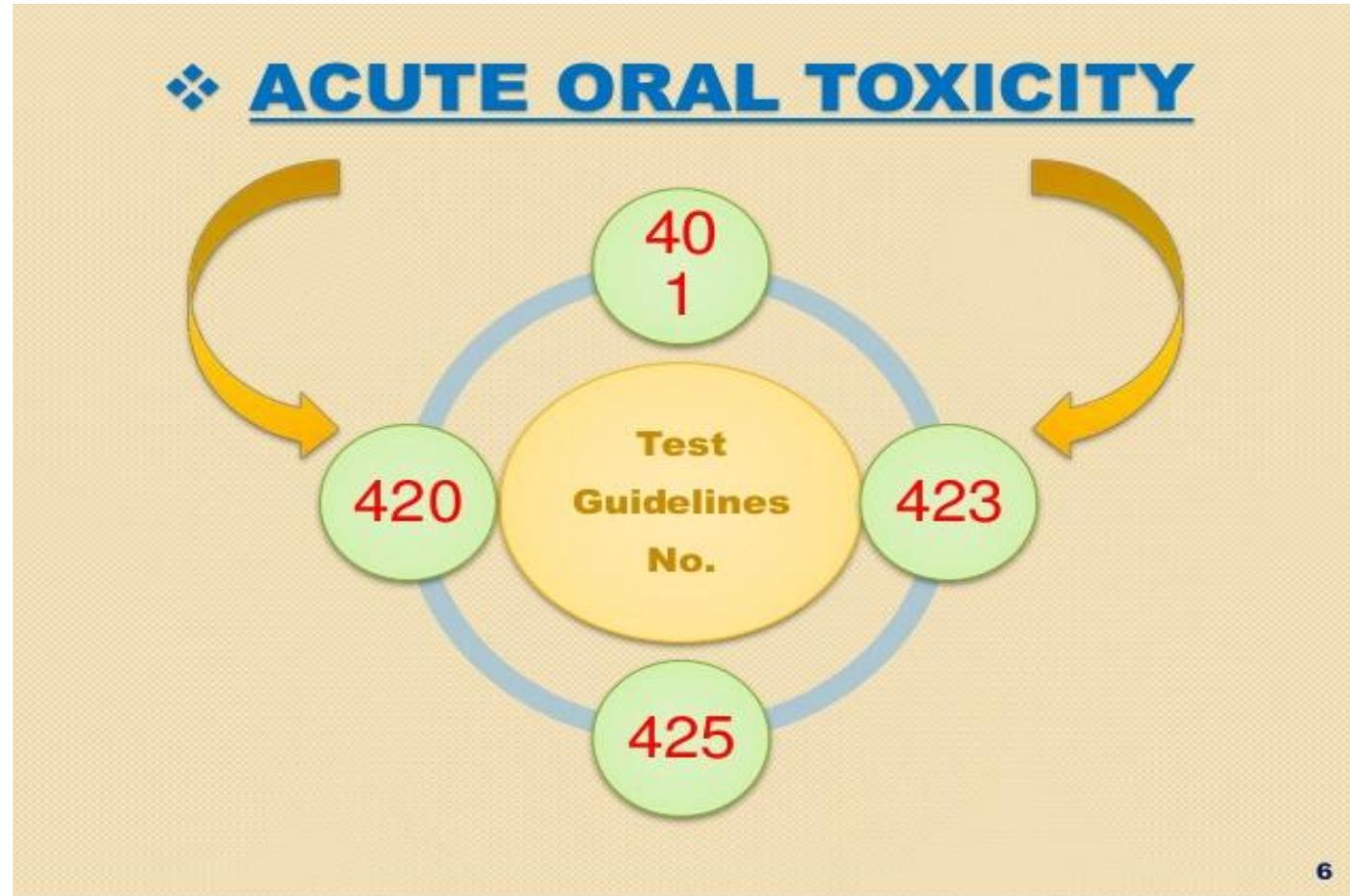
# Perubahan respon menjadi log probit dari kurva distribusi normal

## Experimental design for toxicity tests

---



Jenis metode standar yang digunakan dalam pengujian toksisitas akut oral saat ini

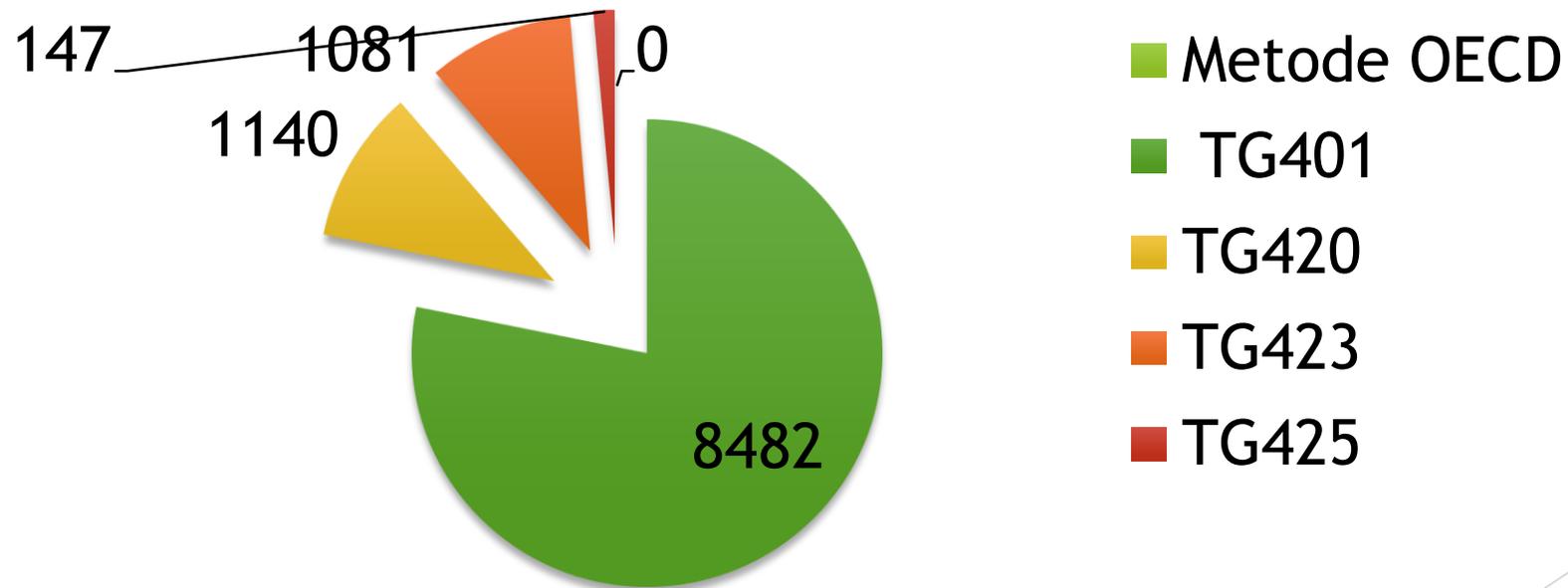


# Perkembangan metode uji

- ▶ Konsep pengujian LD50 pertama kali diperkenalkan pada tahun 1927 untuk melihat potensi toksisitas dari aktivitas biologis seperti dioxin, setelahnya pada akhir 1970 pengujian LD50 dikritik secara ilmiah dan etika hewan, dan kemudian prosedur pengujian mengalami modifikasi dalam jumlah hewan dan penderitaan terhadap hewannya. Modifikasi ini termasuk dalam prosedur
  - ▶ the fixed-dose procedure, OECD TG 420,
  - ▶ the acute-toxic-class method, OECD TG 423,
  - ▶ and the up-and-down procedure, OECD TG 425 .
- ▶ pada tahun 2002 the original LD50 test, OECD 401 , dihapuskan dari OECD guidelines

# Jumlah penggunaan metode

- ▶ The European Chemicals Agency, ECHA berhasil menghimpun data dari 13832 pengujian toksisitas oral terhadap 8568 bahan dari 2008-2014, 75 % masih menggunakan metode TG 401 (11% TG 420, 11% TG 423, dan 1,5% TG 425).

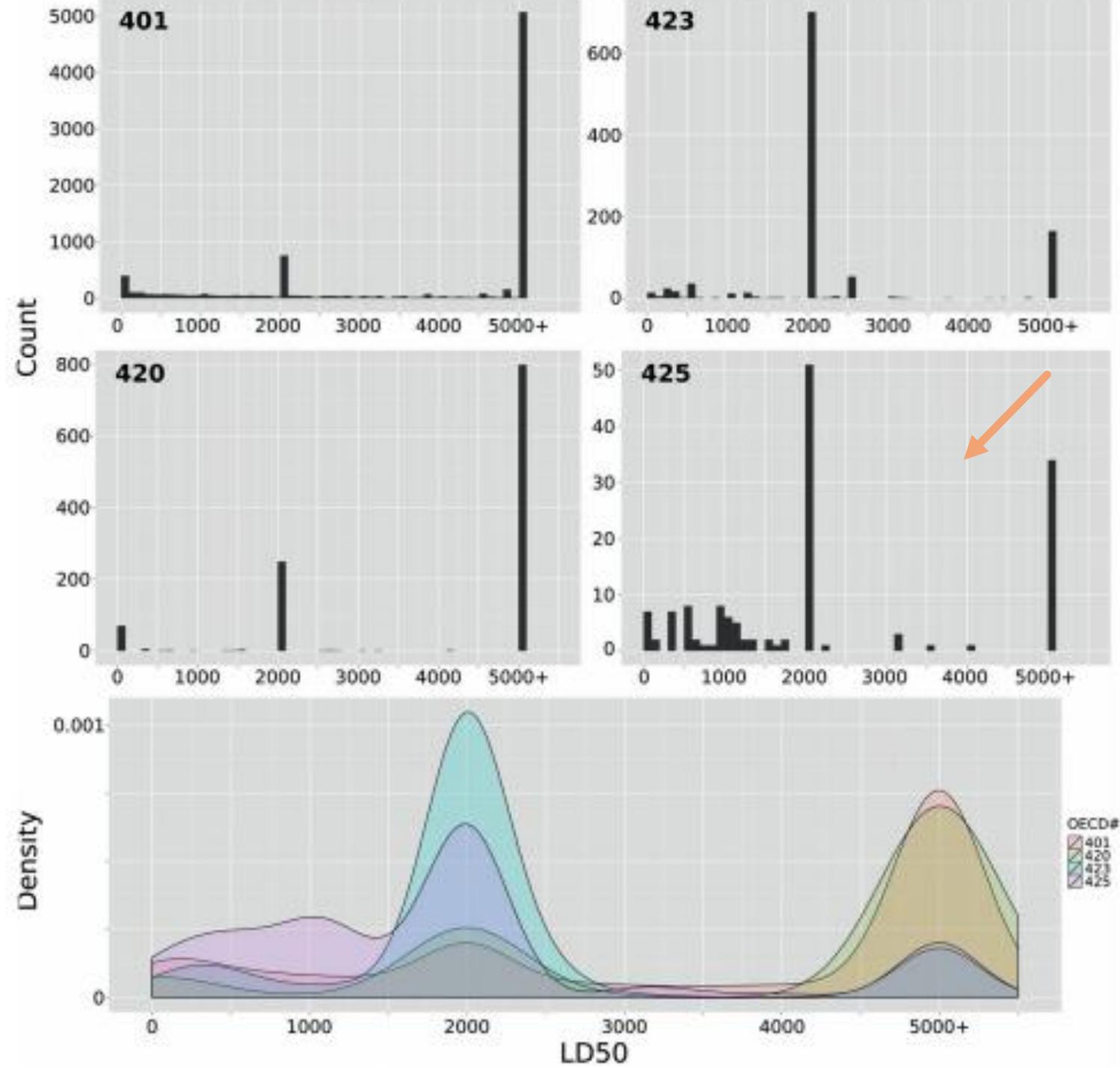


## Analysis of Public Oral Toxicity Data from REACH Registrations 2008-2014

Thomas Luechtefeld 1, Alexandra Maertens 1, Daniel P. Russo 2, Costanza Rovida 4, Hao Zhu 2,3 and Thomas Hartung 1,4 1 Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT), Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Environmental Health Sciences, Baltimore, MD, USA; 2 The Rutgers Center for Computational & Integrative Biology, Rutgers University at Camden, NJ, USA; 3 Department of Chemistry, Rutgers University at Camden, NJ, USA; 4 CAAT-Europe, University of Konstanz, Konstanz, Germany

Rentang hasil pengujian terhadap metode pengujian yang digunakan dalam menghasilkan nilai LD50

Terlihat pemilihan metode 425 lebih banyak digunakan dalam identifikasi bahan dari tipe sangat toksik dan non toksik



**OECD TG 401** menggunakan minimum 4 dosis dengan 5 hewan uji di setiap kelompoknya dan masing masing kelamin sehingga total 40 ditambahkan 5 hewan uji kontrol.

Penghapusan metode **OECD TG 401** dan digantikan dengan metode yang lain sangat efektif mengurangi penggunaan hewan dari 45 hewan menjadi 8-12 hewan. Menjadi salah satu keberhasilan metode dalam toksikologi

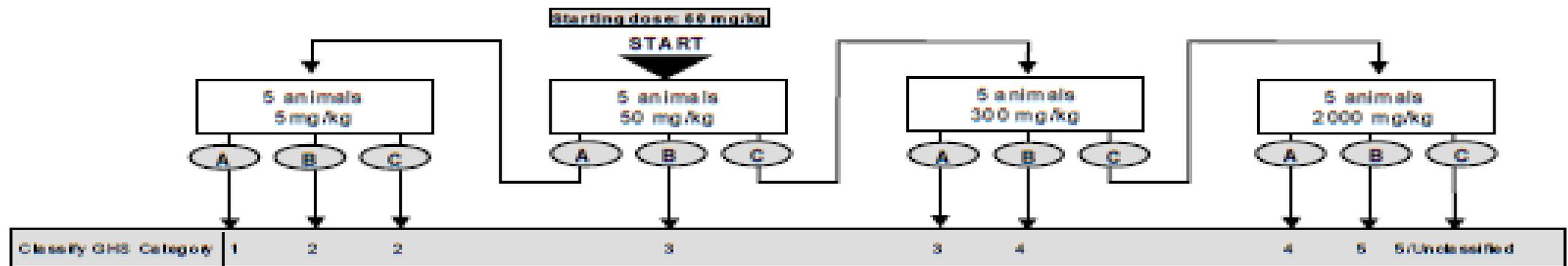
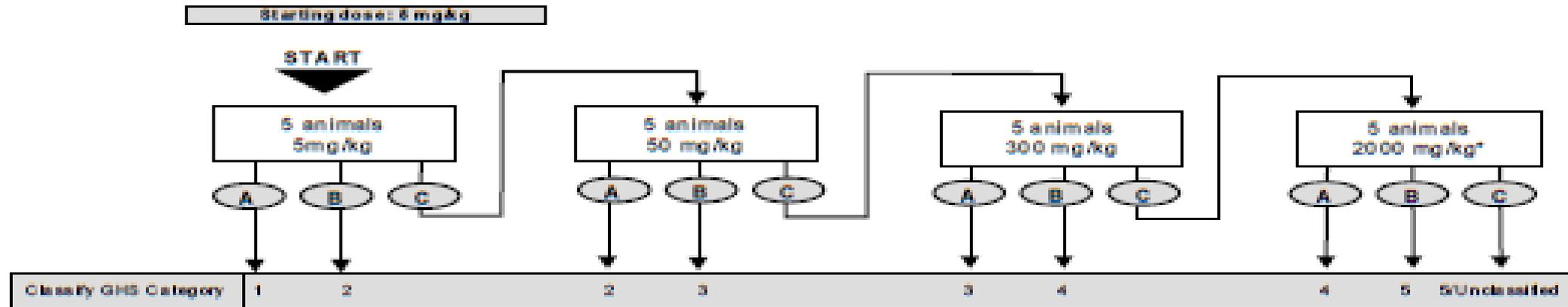
Metode pengganti metode konvensional (401) dengan metode 420 (fixed dose), 423 (Acute Toxic Class) dan 425( up and down procedure)

- ▶ Pengujian TG 420, 423 dan 425 bertujuan untuk mengurangi jumlah hewan yang diperlukan dalam estimasi toksisitas akut oral. Metode ini memungkinkan estimasi LD50 dengan 2 interval nilai dan hasilnya di ranking dan diklasifikasikan mengikuti Global Harmonised System.

## Metode TG 420 (Fixed Dose)

- ▶ Prinsip TG 420 : pengujian terdiri dari pemberian secara fixed (tetap) dari 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg. Permulaan dosis dimulai dari dosis yang mulai memberikan tanda keracunan tanpa efek kematian, jika tidak ada data, maka dimulai dari 300 mg/kg. Pemberian selanjutnya bisa lebih tinggi atau lebih rendah berdasarkan tanda kesakitan.
- ▶ Prosedur ini diteruskan sampai bukti toksisitas dipengujian teridentifikasi

ANNEX 3: FLOW CHART FOR THE MAIN STUDY



Outcome

- A** ≥ 2 deaths
- B** ≥ 1 with evident toxicity and/or < 1 death
- C** No toxicity

Group size

The 5 animals in each main study group will include any animal tested at that dose level in the sighting study

Animal welfare override

If this dose level caused death in the sighting study, then no further animals will be tested. Go directly to outcome **A**

# Metode TG 423 Acute toxic Class

- ▶ Prinsip TG 423 : pengujian dilakukan bertahap dengan menggunakan 3 hewan dari 1 kelamin di setiap tahap. Kehadiran atau tidak terjadi kematian dari satu tahap dievaluasi sebelum melangkah ke tahap selanjutnya dalam menentukan dosis pemberian. Awal dosis dimulai dari salah satu dari 4 dosis yaitu 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg.



# Metode TG 425 ( up and down procedure)

- ▶ Prinsip TG 425 : pengujian dari satu pemberian dosis secara progresif dari 1 hewan uji setiap langkahnya. Hewan pertama menerima dosis lebih rendah dari estimasi nilai LD50 jika tidak ada data maka dimulai dari 175 mg/kg. Jika hewan selamat maka dosis dinaikan dengan faktor 3,2 dari dosis sebelumnya, jika hewan mati maka dosis selanjutnya menurun secara progresif sebesar 3,2 setelah pengamatan 2 hari.

Table 6. Example of stopping criterion (c) from Self-contained Software for OECD Guideline 425

**AOT425StatPgm** [New Test] [Load Data] [Save Data] [Get Report] [Options] [About AOT425] [Exit]

**Test / Substance:** Example of stopping criterion in Paragraph 33 (c) of OECD TG 425

**Test Type:** Main [v] **Assumed values at start of the main test**

**Limit Dose:** 5000 [v] **LD50:** Default **Sigma:** 0.5

Test Seq.	Animal ID	Dose mg/kg	Short-term Outcome	Long-term Outcome	Program's Data Entry Messages
1		175	0	0	
2		550	0	0	
3		1750	X	X	
4		550	0	0	
5		1750	X	X	
6		550	0	0	
7		1750	0	0	
8		5000	X	X	
9		1750	X	X	
10		Stop Dosing			
11					
12					
13					
14					
15					

The main test is complete.  
 Stopping criteria met: LR criterion.  
 Estimated LD50 = 1750 (The one dose with partial response). 95% PL Confidence interval is 651.9 to 2690.

**Table 1.** The principles of the three alternati

	<b>Fixed Dose Procedure (FDP, OECD 420)</b>	<b>Acute Toxic Class Method (ATC, OECD 423)</b>	<b>Up and down Procedure (UDP, OECD 425)</b>
<b>Animals</b>	Young adult rats (one sex)	Young adult rats (one sex)	Young adult rats (one sex)
<b>Dosing Type</b>	Single bolus dose	Single bolus dose	Single bolus dose
<b>Dosing route</b>	Oral gavage with constant volume and concentration	Oral gavage with constant volume and concentration	Oral gavage with constant volume and concentration
<b>Observations</b>	Clinical observations, body weight follow-up	Clinical observations, body weight follow-up	Clinical observations, body weight follow-up
<b>Sighting Study</b>	Yes	No	No
<b>Methodology</b>	Fixed doses of 5, 50, 500, and 2000 mg/kg	Fixed doses of 5, 50, 500, and 2000 mg/kg	Starting at estimation for LD50 (or with 175 mg/kg dose), using a dose
<b>Aim</b>	Determination of lowest fixed dose that causes evident toxicity	Determination of lowest fixed dose that causes mortality	Estimation of LD50
<b>Estimation</b>	Range estimation of LD50	Range estimation of LD50	Point estimation of LD50 with confidence intervals
<b>Necropsy</b>	Yes	Yes	Yes
<b>Endpoint</b>	Sign(s) of acute toxicity in target organ(s)	Sign(s) of acute toxicity in target organ(s)	Sign(s) of acute toxicity in target organ(s)

# Pemilihan metode dan hasil dibandingkan metode LD50 konvensional

- ▶ Perbandingan keberhasilan antara Metode 425 /UDP (up ad down prosedur), metode 420 /FDP (Fixed Dose Prosedure) terhadap metode LD50 Konvensional untuk melihat konsistensi dalam klasifikasi bahaya dari pengujian akut menunjukkan bahwa **23 dari 25** data metode 425 sama, **16 dari 20** metode 420 sama, dan **7 dari 10** antara 420 dan 425 sama, pemilihan kelamin tidak terlalu berpengaruh namun betina menunjukkan hasil lebih sensitif dibandingkan jantan.
- ▶ Tidak seperti 420, metode 425 dapat memberikan nilai LD50 dan memberikan data terhadap klasifikasi nilai bahaya dari substansi kimia.
- ▶ Sumber : [Food and Chemical Toxicology Volume 33, Issue 3, March 1995](#)

## Kelebihan dan kekurangan dari metode 420 423 425 dibandingkan 401 (konvensional)

- ▶ Untuk bahan sampel uji dengan efek yang menyebabkan kematian lebih dari 5 hari. Akan menyebabkan waktu pengerjaan metode 425 sangat signifikan menjadi lebih lama dari pada metode 420 dan 423. tetapi untuk 420 dan 423 menyebabkan pengujian dilanjutkan dengan dosis menjadi lebih rendah atau diharuskan mengulangi lagi pengujian dari awal.

# Uji toksisitas di Indonesia

- ▶ Dengan keunggulan yang dimiliki pada metode 425 berarti kami sepakat untuk menerapkan metoda 425 sebagai SNI 7184.5:2017 khusus untuk Karakteristik Limbah Bahan Berbahaya dan Beracun (B3) dengan up and down procedure

# Tantangan :

- ▶ Hewan Uji Lain : tikus, kelinci, dll ?
- ▶ Paparan : inhalasi dan dermal ?
- ▶ Paparan terhadap manusia?

Terimakasih .....