

Sosialisasi Metode SNI 7184.5:2017

**Karakteristik limbah Bahan Berbahaya Beracun
(B3)- bagian 5: pengujian toksisitas akut
limbah secara oral pada hewan uji mencit : *Up
and Down Procedure***

Oleh :

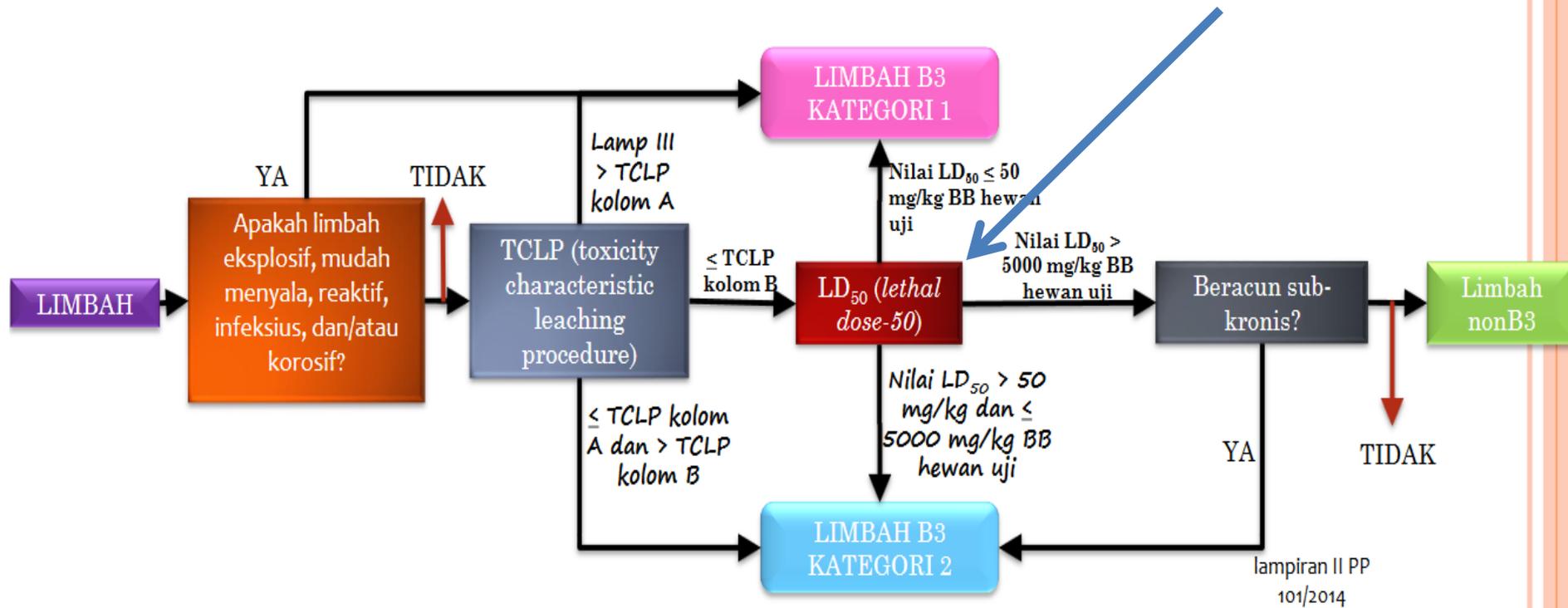
Andriantoro

**Pusat penelitian dan Pengembangan Kualitas dan Laboratorium Lingkungan
kementerian lingkungan Hidup dan Kehutanan**

Bandung, 3 Agustus 2017



TATA CARA UJI KARAKTERISTIK UNTUK PENETAPAN LIMBAH B3 (DILUAR LAMPIRAN I PP 101/2014) OLEH PEMERINTAH



- **Ruang Lingkup**
- Standar ini menetapkan metode pengujian untuk mengetahui nilai LD₅₀ pada limbah berfasa cair, semi padat, dan padat yang akan digunakan sebagai identifikasi limbah B3.
- Pengujian ini dilakukan secara oral dengan *up and down procedure* pada mencit dengan dosis tertinggi 5000 mg/kg berat badan mencit.



Istilah umum

- **Toksisitas akut oral**

efek merugikan yang terjadi setelah pemberian dosis tunggal atau lebih limbah secara oral dalam waktu singkat

- ***Reference Toxicant (RT)***

bahan kimia yang digunakan sebagai acuan pengendalian mutu selama pengujian

- **Maximum Likelihood Method**

Metode statistik untuk memperoleh ukuran seberapa kuat data mendukung perkiraan LD_{50} atau parameter lainnya. Rasio nilai kemungkinan dapat digunakan untuk membandingkan seberapa baik data mendukung berbagai perkiraan LD_{50}



Pemilihan hewan uji & Larutan pembawa

- Hewan
- mencit (*Mus musculus*) yang sehat galur yang sama, kelamin betina dan tidak pernah dikawinkan, berumur 8-10 minggu toleransi bb mencit maksimum sebesar 20% dari rata-rata populasi, disertai surat keterangan sebagai hewan uji
- Larutan pembawa (*vehicle for administration*)
- Bahan yang digunakan untuk membantu membawa contoh uji ke dalam tubuh mencit. Jenis bahan pembawa : **air bebas mineral, minyak jagung, gum arab 0,05%** atau setipe dan sifatnya mempertahankan contoh uji tetap homogen.



Peralatan yang digunakan :

- sonde oral dengan dimensi 16g sampai dengan 22s, panjang minimum 36 mm, dan ujung tumpul membulat;
- *syringe* 1 ml;
- kandang mencit
- neraca teknis dengan ketelitian 0,1 g;
- termohigrometer; dan
- perangkat lunak tertentu untuk menghitung estimasi nilai LD₅₀



Proses Aklimatisasi

- **Persiapan ruangan pengujian**
- Kondisikan ruang uji sebagai berikut.
 - suhu ruangan 20°C sampai dengan 25°C;
 - kelembaban ruangan 50% sampai dengan 80%;
 - atur pencahayaan pada 12 jam terang dan 12 jam gelap serta lakukan rekayasa pencahayaan agar sesuai dengan karakteristik biologis mencit;



Aklimatisasi

Proses adaptasi mencit dengan lingkungan baru, melihat kondisi fisik, serta meminimalisasi efek stress pada mencit yang dapat mempengaruhi pengujian

- Selama aklimatisasi, kelompok mencit dipisah secara bertahap menjadi individu per kandang, mencit sakit dipisahkan
- Makanan diberikan 10% dari BB hingga mencapai BB yang dipersyaratkan, air minum secara *ad libitum*
- Timbang mencit, amati kondisi fisik & motorik setiap hari



Tahap Pengujian



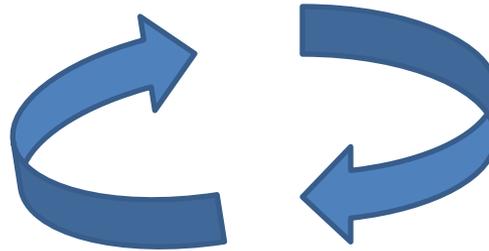
1. Penimbangan



2. Pengelompokan Hewan Uji



3. Pengujian



ADT425StatPgm

Test / Substance: Example of Stopping Criterion in Paragraph 0(3)(4)(A) of this Guideline

Test Type: Main Assumed values at start of the main test

Limit Dose: 5000 LD50: (Default) Sigma: 0.5

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

The main test is complete.
Stopping criteria met: 3 at Limit Dose.
The LD50 is greater than 5000 mg/kg.

6. Input komputer



5. Pengamatan harian



4. Pengamatan

Cara uji

Prinsip dasar Pengujian

1. bahan pembawa (mencit kontrol)
2. *Reference Toxicant (RT)*, dan
3. contoh uji (Sampel)

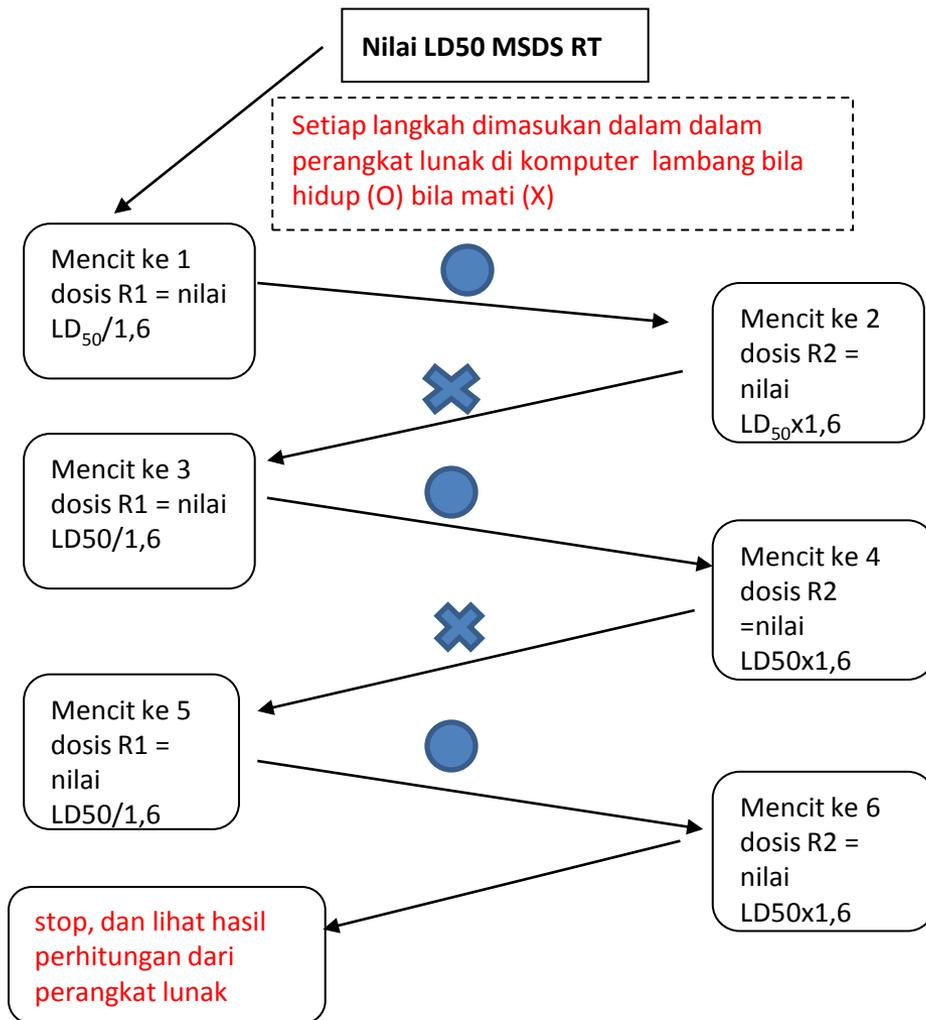
ke dalam lambung pada mencit yg berbeda dilakukan pada hari yang sama dengan memasukkannya secara oral dengan dosis tertentu menggunakan sonde kemudian diamati selama 7 hari



Up and Down Procedure untuk RT

- Pengujian RT dilakukan untuk menilai sensitifitas dan variasi mencit (variasi sumber hewan uji yang belum standar di INA)
- Dosis awal pengujian untuk RT yang diberikan adalah 1,6 kali lebih rendah dari LD50 yang tertera pada *Material Safety Data Sheet*
- Berdasarkan metode *up and down* dari OECD 425, pengalihan antar dosis yang ditetapkan oleh OECD 425 adalah 3,2. Sehingga jika nilai LD50 sudah diketahui, maka untuk menghitung dosis pertama dan dosis selanjutnya adalah dengan menaikkan atau menurunkan (*up – down*) dosis dengan cara membagi atau mengalikan nilai LD50 pada MSDS dengan 1,6 (faktor pengalihan 3,2 dibagi dengan 2 = 1,6).





R1 adalah dosis bawah pengujian untuk RT yang diberikan (1,6 kali lebih rendah dari LD_{50} yang tertera pada MSDS RT)

R2 adalah dosis atas pengujian untuk RT yang diberikan (1,6 kali lebih tinggi dari LD_{50})



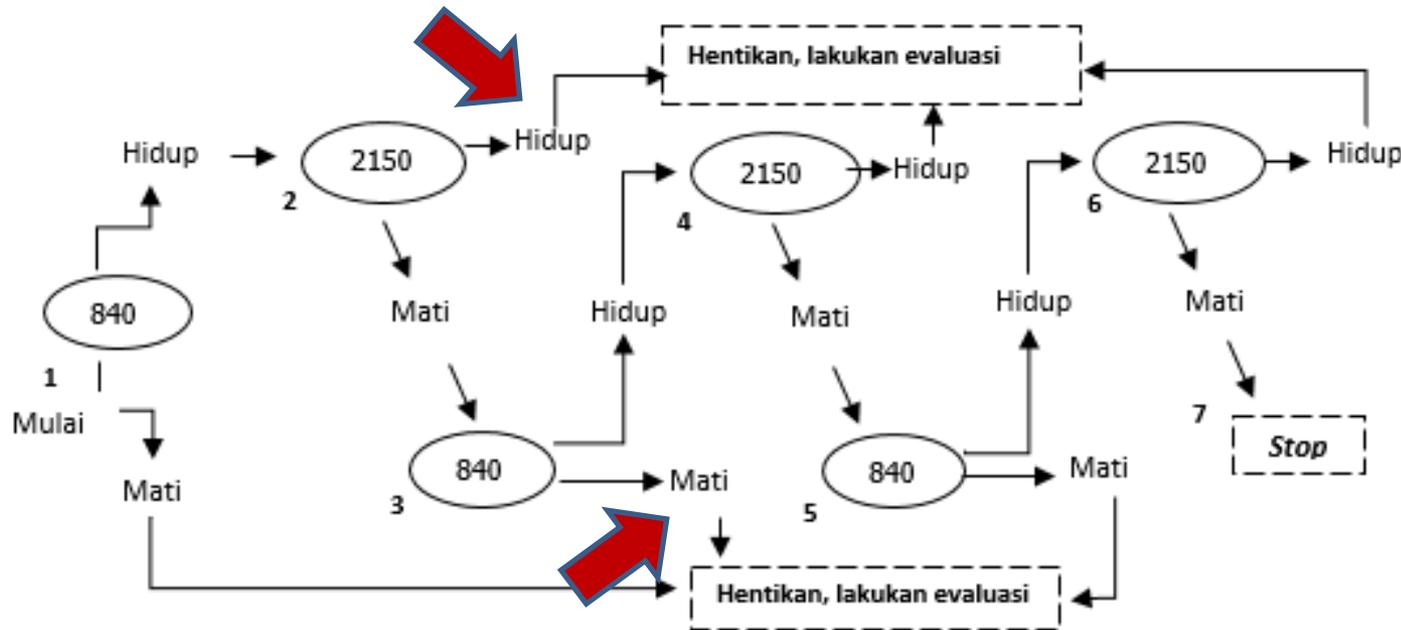
Contoh Reference Toxicant menggunakan CuSO_4 pada mencit dengan berat badan 20 gram. Berdasarkan MSDS CuSO_4 toksisitas akut oral (LD_{50}) terhadap mencit sebesar 1344 mg/kg berat badan mencit.

$$\begin{aligned} \text{Dosis Awal} &= \text{Nilai } \text{LD}_{50} : 1,6 = 1344 \text{ mg/kg} : 1,6 = 840 \text{ mg/kg} \\ &= 840 \text{ mg/kg} \times \frac{20 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \\ &= 17,6 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis atas} &= \text{Nilai } \text{LD}_{50} \times 1,6 = 1344 \text{ mg/kg} \times 1,6 = 2150 \text{ mg/kg} \\ &= 43 \text{ mg} \end{aligned}$$



Bila nilai RT 1344 mg/kg bb



R1 = dosis bawah pengujian untuk RT yang diberikan (1,6 kali lebih rendah dari LD_{50} yang tertera pada MSDS RT)

R2 = dosis atas pengujian untuk RT yang diberikan (1,6 kali lebih tinggi dari LD_{50})

1-7 = langkah kerja

840:2150 = dosis contoh uji yang diberikan pada mencit dalam mg/kg berat badan mencit

Tampilan di perangkat lunak

AOT425StatPgm - DATA 1. dat

New Test Load Data Save Data Get Report Options About AOT425 Exit

Test / Substance: copper (II) sulphate pentahydrate

Test Type: Main

Limit Dose: 5000

Assumed values at start of the main test:
LD50: Default **Sigma:** 0.5

Test Seq.	Animal ID	Dose mg/kg	Short-term Outcome	Long-term Outcome	Program's Data Entry Messages
1	1	840	0	0	
2	2	2150	X	X	
3	3	840	0	0	
4	4	2150	X	X	
5	5	840	0	0	
6	6	2150	X	X	
7		Stop Dosing			
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

The main test is complete.

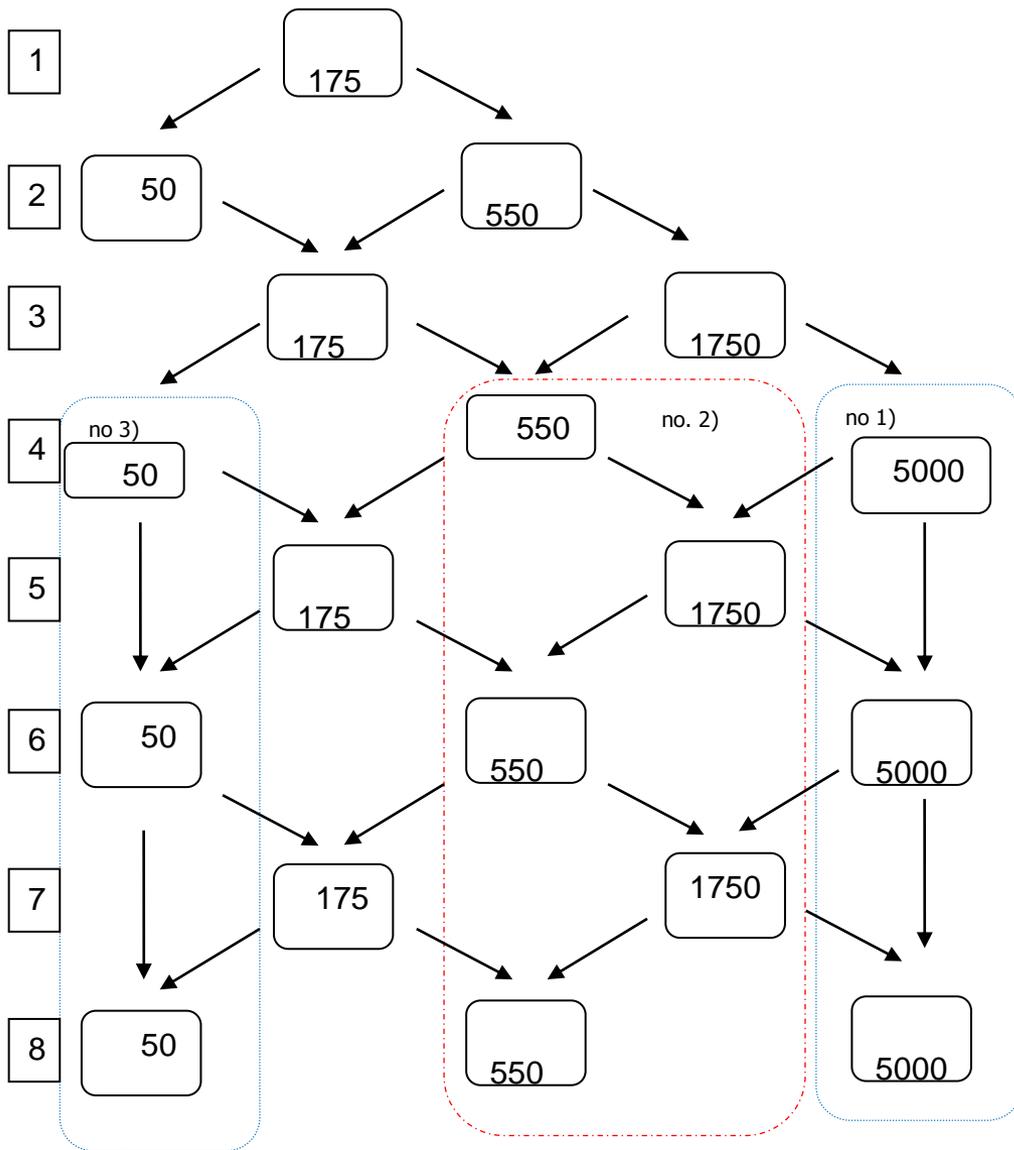
Stopping criteria met: 5 reversals in 6 tests. LR criterion.
Estimated LD50 = 1344 (Based on an assumed sigma of 0.5). Approximate 95% confidence interval is 840 to 2150.



Penentuan nilai LD₅₀ pada contoh uji

- pilih satu ekor mencit baru. Timbang mencit, beri tanda pada mencit tersebut sesuai kode analisis di komputer.
- Masukkan mencit ke dalam kandang, sesuai dengan tanda yang tertera pada mencit;
- mencit dipuasakan dahulu 3 - 4 jam sebelum diberikan dosis, kemudian berikan contoh uji pada mencit dengan dosis awal **175 mg/kg** berat badan mencit
- berikan makan mencit 1 jam sampai dengan 2 jam setelah pemberian dosis .
 - amati kondisi mencit dalam **48 jam** lalu input hasil ke komputer





keterangan gambar

↘ = jika mencit hidup
 ↙ = jika mencit mati

1-8 = langkah kerja, urutannya mengikuti respon mencit (mati/hidup) yang kemudian dimasukkan dalam komputer
 50;175;550;1750;5000 adalah dosis contoh uji yang diberikan pada mencit dalam mg/kg berat badan mencit



Catatan hasil pengujian

- kriteria pengujian, yaitu:

1. Tiga hewan hidup pada batas atas pengujian (5000 mg/kg);

The screenshot displays the AOT425StatPgm software interface. The window title is "AOT425StatPgm" and the menu bar includes "New Test", "Load Data", "Save Data", "Get Report", "Options", "About AOT425", and "Exit".

Test / Substance: Example of Stopping Criterion in Paragraph (i)(3)(ii)(A) of this Guideline

Test Type: Main

Limit Dose: 5000

Assumed values at start of the main test:
LD50: Default Sigma: 0.5

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

The main test is complete.
Stopping criteria met: 3 at Limit Dose.
The LD50 is greater than 5000 mg/kg.

2. Tiga hewan uji hidup pada dosis rendah dan 3 kematian pada dosis atas dimulai dari dosis rendah saat ditemukan mencit yang hidup, setelah itu dilakukan uji pada konsentrasi diatas dosis rendah tersebut dan hasilnya mati dan uji pada kedua konsentrasi ini dilakukan sebanyak 2x (*vice versa*);

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

Test / Substance: Example of Stopping Criterion in Paragraph (i)(3)(iii)(C) of this Guideline

Test Type: Main

Limit Dose: 5000

Assumed values at start of the main test:
LD50: Default **Sigma:** 0.5

Test Seq.	Animal ID	Dose mg/kg	Short-term Outcome	Long-term Outcome	Program's Data Entry Messages
1	1	175	0	0	
2	2	550	0	0	
3	3	1750	X	X	←
4	4	550	0	0	
5	5	1750	X	X	←
6	6	550	0	0	
7	7	1750	0	0	
8	8	5000	X	X	←
9	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.

3. Pengujian dihentikan jika ditemukan 3x kematian pada dosis yang sama

The screenshot shows the AOT425StatPgm software interface. The window title is 'AOT425StatPgm'. The menu bar includes 'New Test', 'Load Data', 'Save Data', 'Get Report', 'Options', 'About AOT425', and 'Exit'. The main area contains several input fields and a table.

Test / Substance: Enter test description.

Test Type: Main

Limit Dose: 5000

Assumed values at start of the main test:
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	X	X	
2		50	X	X	
3		17.5	0	0	
4		50	X	X	
5		17.5	0	0	
6		50	X	X	
7		17.5	0	0	
8		Stop Dosing			
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

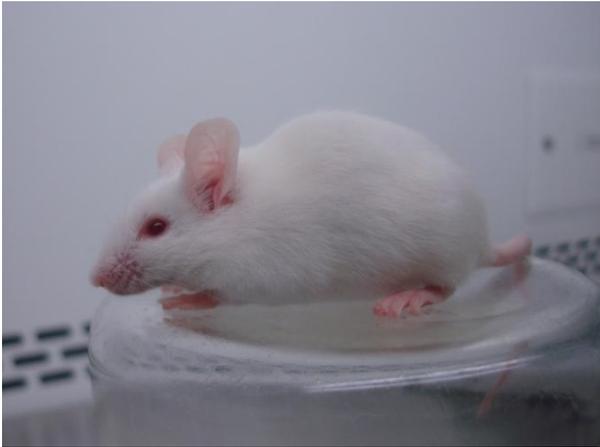
The main test is complete.

Stopping criteria met: 5 reversals in 6 tests. LR criterion.
Estimated LD50 = 28.3 (Based on an assumed sigma of 0.5). Approximate 95% confidence interval is 17.5 to 50.

Pengamatan

- Pengamatan mencit dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian *reference toxicant* maupun contoh uji terhadap aktivitas dan gejala toksisitas mencit. Pengamatan ini nantinya akan menjadi data kualitatif.
- lakukan pengamatan secara individual sedikitnya 30 menit sekali dari mulai pemberian perlakuan hingga 4 jam setelah pemberian.
- lakukan pengamatan setelah 24 jam hingga 7 hari, kecuali jika hewan mati. Mencit dinyatakan sehat berdasarkan pengamatan visual meliputi perubahan fisik, mukosa, gerakan motorik, rangsang syaraf, sirkulasi, pola perilaku, dan tanda keracunan yang muncul.
- hasil pengamatan dicatat pada lembar kerja





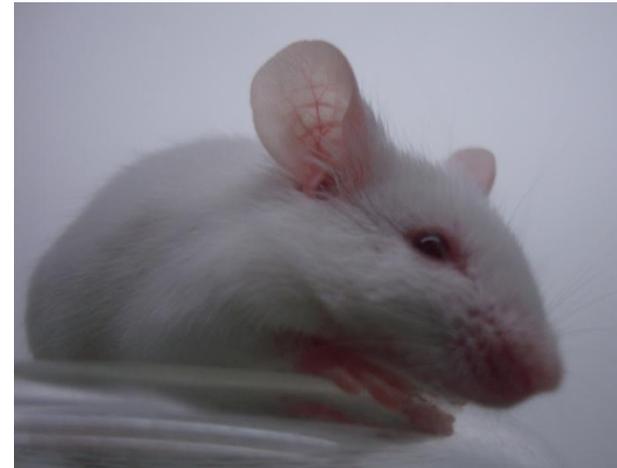
Platform : bentuk postur tubuh hewan dalam keadaan diam



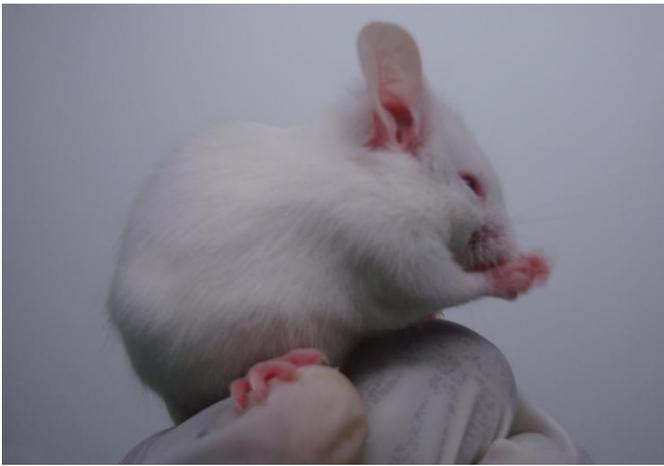
Reflek pineal : reaksi rangsang cuping telinga terhadap sentuhan



Aktivitas motorik intuitif : hewan melakukan intuisi untuk melakukan pengenalan lingkungan baru



Ptosis : abnormalitas mata, seperti kelopak mata menutupi atau mata yang membengkak



Grooming : proses mencuci dan menjilati bulu serta anggota tubuh lainnya dalam keadaan normal



Retablismen: gerakan motorik tubuh untuk memanjat pada batang menahan gravitasi → berada di posisi horizontal pada platform

Tremor : gemetar tidak sengaja atau gemetar dalam satu atau lebih bagian tubuh

Straub : kondisi ekor berdiri karena gangguan internal syaraf mempengaruhi kesetimbangan tubuh

Piloereksi : kondisi bulu tegak karena hewan mengalami ketegangan

Lakrimasi : keluarnya cairan mukosa dari mulut, hidung, mata

Urinasi : mengeluarkan urine secara berlebihan

Defekasi : mengeluarkan feses dalam bentuk tidak normal, terlalu padat atau cair

Pemusnahan limbah

- Semua limbah dari pengujian LD₅₀, meliputi mencit, *syringe*, dan limbah lainnya yang digunakan dalam pengujian diangkut dan diolah oleh pihak yang mempunyai ijin operasional insinerator dari instansi teknis yang bertanggung jawab
- Sedangkan limbah cair yang dihasilkan selama pengujian dikelola sesuai prosedur yang berlaku

Terima kasih

Literatur Terkait

*Institutional Animal Care and Use
Committee Guidebook. 2002*

*AAALAC Guideline for Animal in Research.
2011*

*Organization for Economic Coopera-tion &
Development (OECD) 425 (Acute Oral
Toxicity: Up-and-Down Procedure) 2008.*

AOT425statpgm

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/section4software.htm>

<https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/acute-oral-toxicity-and-down-procedure>

Terima kasih kepada

P3KLL -KLHK

PUSTANLINGHUT-KLHK

Kontributor

Yayah Rodiana

Retno Puji Lestari

Komtek 13-03 Kualitas Lingkungan



Diskusi dan informasi

Kontak email : [toroandr1@gmail](mailto:toroandr1@gmail.com)

Whatsapp : 085881469717