



UNIVERSITAS INDONESIA

**VALIDASI UJI TOKSISITAS AKUT METODE
ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND
DEVELOPMENT (OECD) 425 PADA MENCIT BETINA
MENGUNAKAN TEMBAGA (II) SULFAT PENTAHIDRAT**

SKRIPSI

SRI RAHAYU WIDYA NINGRUM

0806328114

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI FARMASI

DEPOK

JULI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**VALIDASI UJI TOKSISITAS AKUT METODE
ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND
DEVELOPMENT (OECD) 425 PADA MENCIT BETINA
MENGUNAKAN TEMBAGA (II) SULFAT PENTAHIDRAT**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Farmasi**

SRI RAHAYU WIDYA NINGRUM

0806328114

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI FARMASI

DEPOK

JULI 2012

ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Sri Rahayu Widya N

NPM : 0806328114

Tanda Tangan : 

Tanggal : 13 Juli 2012

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 13 Juli 2012



Sri Rahayu Widya Ningrum

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Sri Rahayu Widya Ningrum
NPM : 0806328114
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Validasi Uji Toksisitas Akut Metode Organization For Economic Cooperation And Development (OECD) 425 Pada Mencit Betina Menggunakan Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat

Pembimbing I : Dra. Juheini Amin, M.Si., Apt. (.....)

Pembimbing II : Yayah Rodiana, M.Sc. (.....)

Penguji I : Dra. Retnosari Andrajati., M.S., Ph.D., Apt. (.....)

Penguji II : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 13 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Validasi Uji Toksisitas Akut Metode Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 425 pada Mencit Betina menggunakan Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat”. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dra. Juheini Amin, M.Si., Apt. selaku pembimbing pertama skripsi dan Yayah Rodiana., M.Sc. selaku pembimbing kedua skripsi yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan, saran, dan nasehat dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini;
2. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., Apt. selaku ketua Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia yang telah memberikan kesempatan pada penulis untuk melaksanakan penelitian;
3. Dra. Maryati K, M.Si., Apt, selaku pembimbing akademik yang telah memberikan saran dan ijin untuk dapat melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini;
4. drh. Cynthia Devy Irawati selaku Penyelia Lab Patologi Balai Besar Pengembangan Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) serta Bapak Mustapa Kamal yang telah bersedia menyediakan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk memberikan bimbingan, pengarahan, dukungan, serta saran yang bermanfaat selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini;
5. Seluruh dosen pengajar, laboran, staf, dan karyawan Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia yang

telah membantu kelancaran dalam perkuliahan, penelitian, dan penyusunan skripsi ini;

6. Seluruh pegawai, analis, maupun karyawan di Pusat Sarana Pengendalian Dampak Lingkungan-Kementerian Lingkungan Hidup (Pusarpedal-KLH) dan Balai Besar Pengembangan Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) yang telah membantu kelancaran dalam penelitian serta penyusunan skripsi ini;
7. Keluarga saya tercinta: ayah, mama, adik-adiku tersayang, yang telah memberikan do'a dan dukungan penuh selama masa perkuliahan dan seluruh keluarga besar untuk kasih sayang, kesabaran, dukungan, dan doa yang tiada hentinya;
8. Teman-teman Farmasi angkatan 2008 beserta para sahabat yang telah berjuang dan menghabiskan waktu bersama di farmasi sehingga membuat masa-masa perkuliahan menjadi menyenangkan; serta
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan yang telah turut serta menjadi bagian dalam terselesainya perkuliahan, penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis berharap Allah SWT membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan dalam penulisan skripsi. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu farmasi.

Penulis,
2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sri Rahayu Widya Ningrum
NPM : 0806328114
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Validasi Uji Toksisitas Akut Metode Organization For Economic Cooperation And Development (OECD) 425 Pada Mencit Betina Menggunakan Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 13 Juli 2012
Yang menyatakan



(Sri Rahayu Widya Ningrum)

ABSTRAK

Nama : Sri Rahayu Widya Ningrum
Program Studi : Farmasi
Judul : Validasi Uji Toksisitas Akut Metode *Organization For Economic Cooperation And Development* (OECD) 425 pada Mencit Betina Menggunakan Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat

Hingga saat ini di Indonesia belum ada metode uji toksisitas akut limbah yang terakreditasi oleh Komite Akreditasi Nasional (KAN). *Organization for Economic Cooperation & Development* (OECD) merupakan salah satu organisasi yang sudah mengeluarkan prosedur standar pengujian toksisitas lingkungan OECD 425 secara internasional. Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis apakah metode OECD 425 memenuhi persyaratan validasi yaitu akurasi dan presisi serta dapat digunakan sebagai metode standar pengujian toksisitas akut limbah di Indonesia. Pada penelitian ini digunakan tembaga (II) sulfat pentahidrat sebagai *reference toxicant* untuk mengetahui nilai LD₅₀ dan pengaruh pemberian larutan tersebut pada hati dan ginjal. Hewan uji berupa mencit betina galur DDY sebanyak 120 ekor. Kelompok perlakuan diberi tembaga (II) sulfat pentahidrat dengan dosis berturut-turut 840 dan 2150 mg/kg bb, sedangkan kelompok kontrol diberi akuades. Nilai LD₅₀ ditentukan dengan *software* AOT425StatPgm, kemudian dilakukan validasi nilai LD₅₀ tersebut. Hasil uji toksisitas akut oral OECD 425 menunjukkan nilai LD₅₀ tembaga (II) sulfat pentahidrat 1344 mg/kg bb yang sesuai dengan literatur. Pemeriksaan histologi hati dan ginjal menunjukkan adanya pengaruh pemberian dosis 840 mg/kg bb dan 2150 mg/kg bb. Metode pengujian toksisitas akut oral OECD 425 memenuhi persyaratan akurasi dan presisi serta dapat menjadi metode acuan untuk pengujian toksisitas akut oral limbah di Indonesia.

Kata kunci : Limbah, OECD 425, *Reference Toxicant*, Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat, Uji Toksisitas Akut, Validasi.
xvi + 96 halaman : 27 gambar; 15 tabel; 17 lampiran
Daftar Pustaka : 63 (1975-2012)

ABSTRACT

Name : Sri Rahayu Widya Ningrum
Programe Study : Pharmacy
Title : Validation of Acute Oral Toxicity Organization For Economic Cooperation And Development (OECD) 425 Method in Female Mice Using Copper (II) Sulphate Pentahydrate.

Up to this time in Indonesia, an acute oral toxicity test of waste hasn't been accredited by the National Accreditation Committee (KAN). Organization for Economic Cooperation & Development (OECD) is one of the organization which published an OECD 425 guideline method for environmental toxicology testing internationally. This study was intended to find out whether the OECD 425 method can satisfy the accuracy and precision of validation criteria and can be used as the standard acute toxicity test for waste in Indonesia. Copper (II) sulphate pentahydrate was used as a reference toxicant in order to determine the LD₅₀ value and determine the effect of the solution on liver and kidney. One hundred and twenty DDY female mice were used in the trial. Treated groups were given the reference toxicant solution of copper (II) sulphate pentahydrate with dose of 840 and 2150 mg/kg bw, while control group was given the aquadest. LD₅₀ value was determined by AOT425StatPgm software. The results of the acute oral toxicity OECD 425 test showed that LD₅₀ value of copper (II) sulphate pentahydrate was 1344 mg/kg bw which was in agreement with literature. The histology examinations data showed that administration of the reference toxicant solution dose 840 mg/kg bw and 2150 mg/kg bw affect the liver and kidney of mice. Acute oral toxicity OECD 425 method has proved its accuracy and precision of validation criteria, thus can be used as the reference acute toxicity method for waste in Indonesia.

Key Words : Acute Toxicity Test, Copper (II) Sulphate Pentahydrate, OECD 425, Reference Toxicant, Validation, Waste.

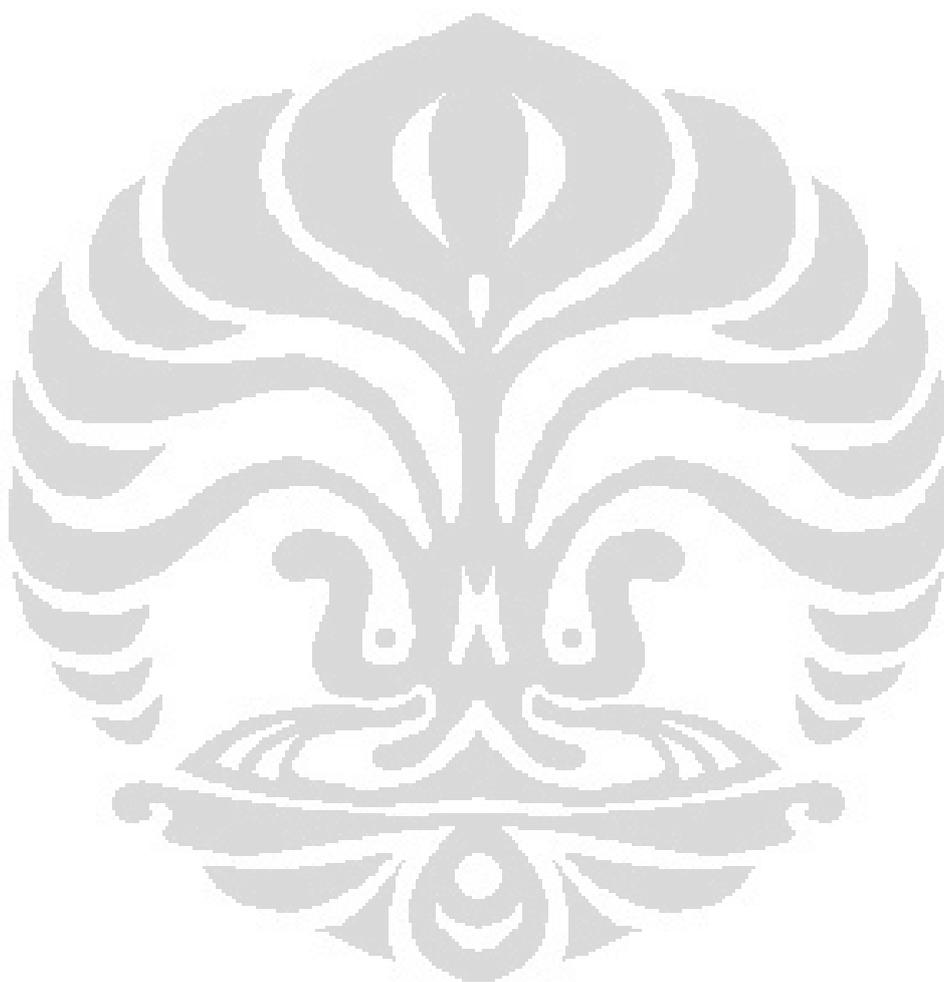
xvi + 96 pages : 27 pictures; 15 tables; 17 appendices

Bibliography : 63 (1975-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.1 Perumusan Masalah dan Ruang Lingkup.. ..	3
1.1 Jenis Penelitian dan Metode yang Digunakan.. ..	4
1.1 Tujuan Penelitian.. ..	4
1.1 Manfaat Penelitian.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Validasi Metode	5
2.2 Toksisitas.....	8
2.3 Metode Uji Toksisitas Akut (<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>) OECD	10
2.4 <i>Reference Toxicant</i>	14
2.5 Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat.....	16
2.6 Hati.....	18
2.7 Ginjal.....	20
3. METODE PENELITIAN	23
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	23
3.2 Bahan.....	23
3.3 Peralatan.....	24
3.4 Cara Kerja.....	25
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Pengujian Nilai LD50 Metode OECD 425.. ..	32
4.2 Pembuatan <i>Control Chart</i> Uji Toksisitas Akut Metode OECD 425.....	33
4.3 Pengamatan Perilaku Mencit selama Uji Toksisitas Akut.. ..	34
4.4 Pengaruh <i>Reference Toxicant</i> terhadap Berat Badan Mencit selama Uji Toksisitas Akut.. ..	36
4.5 Pengamatan Makroskopik Organ.....	37
4.6 Pengamatan Mikroskopik Organ.. ..	40
4.7 Keterbatasan Penelitian.....	45

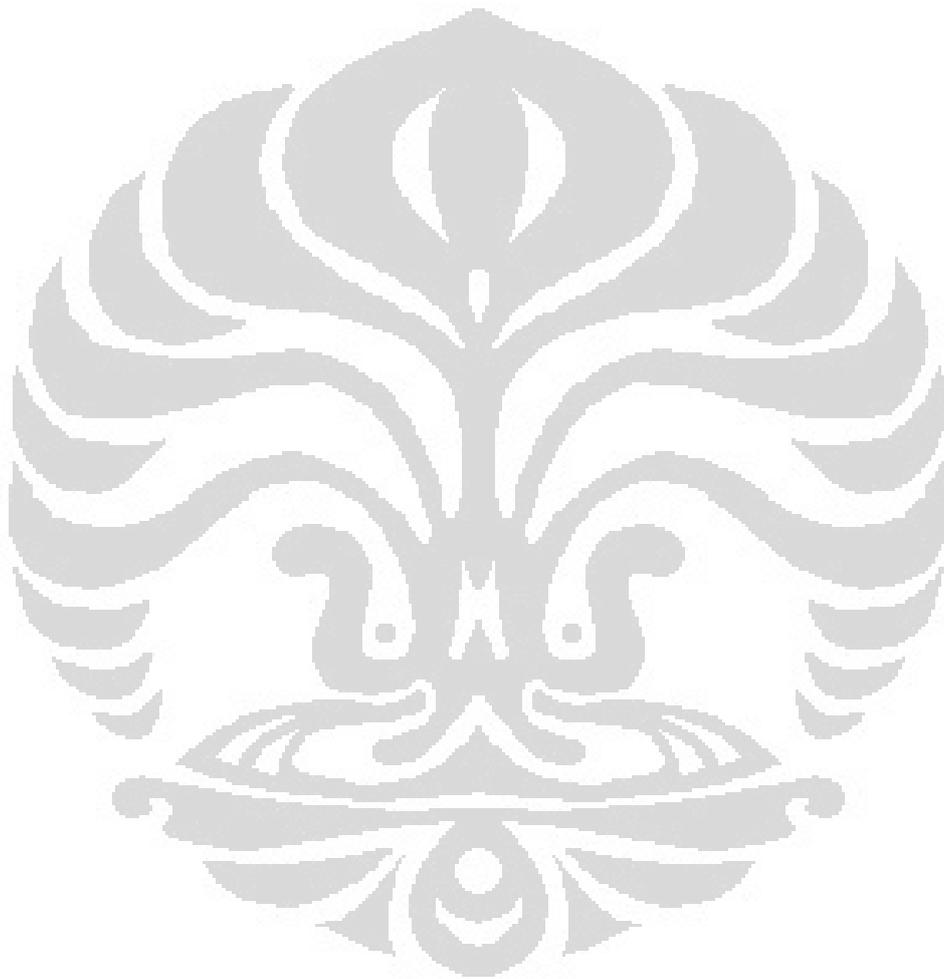
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	47
5.1 Kesimpulan	47
5.2 Saran.....	48
DAFTAR ACUAN	49



DAFTAR GAMBAR

Gambar 4.1	Tahap-tahap Penelitian	54
Gambar 4.2	Tembaga (II) sulfat pentahidrat	55
Gambar 4.3	Diagram <i>control chart</i> LD ₅₀ hasil pengujian toksisitas Akut metode OECD 425... ..	34
Gambar 4.4	Perubahan berat badan mencit tiap kelompok Perlakuan.....	37
Gambar 4.5	Morfologi hati mencit tiap perlakuan pada pengamatan 7 hari...56	
Gambar 4.6	Morfologi hati mencit tiap perlakuan pada pengamatan 14 hari.56	
Gambar 4.7	Diagram batang persen bobot basah rata-rata organ hati terhadap berat tubuh mencit tiap perlakuan.....	57
Gambar 4.8	Diagram batang persen bobot basah rata-rata organ ginjal terhadap berat tubuh mencit tiap perlakuan.....	57
Gambar 4.9	Morfologi ginjal mencit tiap perlakuan pada pengamatan 7 hari..58	
Gambar 4.10	Morfologi ginjal mencit tiap perlakuan pada pengamatan 14 hari.58	
Gambar 4.11	Prosedur histologi jaringan.....	59
Gambar 4.12	Gambaran histologis hati mencit kontrol normal dengan perbesaran 400x pada pengamatan 7 hari.....	61
Gambar 4.13	Gambaran histologis hati mencit kontrol normal dengan perbesaran 400x pada pengamatan 14 hari	61
Gambar 4.14	Gambaran histologis hati mencit dosis 840 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 7 hari.....	62
Gambar 4.15	Gambaran histologis hati mencit dosis 840 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 14 hari.....	62
Gambar 4.16	Gambaran histologis hati mencit dosis 2150 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 7 hari.....	63
Gambar 4.17	Gambaran histologis hati mencit dosis 2150 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 14 hari.....	63
Gambar 4.18	Diagram batang rata-rata diameter vena sentralis hati mencit tiap perlakuan	64
Gambar 4.19	Diagram batang persentase derajat kerusakan hati mencit tiap perlakuan	64
Gambar 4.20	Gambaran histologis kompleks jukstaglomerulus ginjal mencit kontrol normal dengan perbesaran 400x pada pengamatan 7 hari.....	65
Gambar 4.21	Gambaran histologis kompleks jukstaglomerulus ginjal mencit kontrol normal dengan perbesaran 400x pada pengamatan 14 hari.....	65
Gambar 4.22	Gambaran histologis kompleks jukstaglomerulus ginjal mencit dosis 840 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 7 hari.....	66
Gambar 4.23	Gambaran histologis kompleks jukstaglomerulus ginjal mencit dosis 840 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 14 hari.....	66
Gambar 4.24	Gambaran histologis kompleks jukstaglomerulus ginjal mencit dosis 2150 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 7 hari.....	67

Gambar 4.25	Gambaran histologis kompleks jukstaglomerulus ginjal mencit dosis 2150 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 14 hari.....	67
Gambar 4.26	Diagram batang rata-rata diameter glomerulus ginjal mencit tiap perlakuan	68
Gambar 4.27	Diagram batang rata-rata jarak ruang antara glomerulus dan kapsula bowman mencit tiap perlakuan	68



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Klasifikasi tingkat toksisitas zat kimia/bahan/senyawa berdasarkan nilai LD ₅₀	9
Tabel 2.2	Perbedaan metode uji toksisitas akut oral yang dikeluarkan oleh OECD.....	14
Tabel 3.1	Komposisi larutan yang digunakan dalam pembuatan sediaan histologi.....	24
Tabel 4.1	Data hasil pengujian nilai LD ₅₀	33
Tabel 4.2	Gejala toksisitas yang muncul setelah pajanan larutan <i>reference toxicant</i> tembaga (II) sulfat pentahidrat	35
Tabel 4.3	Data persen berat basah hati terhadap bobot tubuh mencit tiap kelompok perlakuan	39
Tabel 4.4	Data berat basah ginjal terhadap bobot tubuh mencit tiap kelompok perlakuan	40
Tabel 4.5	Data rata-rata diameter vena sentralis hati mencit tiap perlakuan ...	42
Tabel 4.6	Data rata-rata diameter glomerulus ginjal mencit tiap perlakuan	44
Tabel 4.7	Data rata-rata jarak ruang antara glomerulus dan kapsula bowman ginjal mencit tiap perlakuan	45
Tabel 4.8	Hasil berat badan dan persen bobot basah hati dan ginjal terhadap berat badan mencit tiap kelompok perlakuan pada 7 hari pengamatan.....	69
Tabel 4.9	Hasil pengukuran rata-rata diameter vena sentralis hati, derajat kerusakan hati, diameter glomerulus ginjal, dan rata-rata jarak ruang antara glomerulus dan kapsula bowman pada 7 hari pengamatan.....	72
Tabel 4.10	Hasil berat badan dan persen bobot basah hati dan ginjal terhadap berat badan mencit tiap kelompok perlakuan pada 14 hari pengamatan.....	75
Tabel 4.11	Hasil pengukuran rata-rata diameter vena sentralis hati, derajat kerusakan hati, diameter glomerulus ginjal, dan rata-rata jarak ruang antara glomerulus dan kapsula bowman pada 14 hari pengamatan.....	76
Tabel 4.12	Hasil reipitabilitas dan akurasi nilai ld50 tembaga (ii) sulfat pentahidrat menggunakan metode OECD 425 “ <i>Up-and-Down Procedure</i> ”	77

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Kriteria penghentian pengujian toksisitas akut oral metode OECD 425	78
Lampiran 2.	Tabel konversi perhitungan dosis.....	81
Lampiran 3.	Dosis konversi tembaga (II) sulfat pentahidrat	82
Lampiran 4.	Pembuatan larutan tembaga (II) sulfat pentahidrat	83
Lampiran 5.	Daftar pemeriksaan fisik dan pengamatan hewan dalam uji toksisitas akut metode OECD.....	84
Lampiran 6.	Hasil pengujian toksisitas akut oral berdasarkan <i>software</i> AOT425StatPgm pada pengamatan 7 hari ulangan I	85
Lampiran 7.	Hasil pengujian toksisitas akut oral berdasarkan <i>software</i> AOT425StatPgm pada pengamatan 7 hari ulangan II.....	86
Lampiran 8.	Hasil pengujian toksisitas akut oral berdasarkan <i>software</i> AOT425StatPgm pada pengamatan 7 hari ulangan III.....	87
Lampiran 9.	Hasil pengujian toksisitas akut oral berdasarkan <i>software</i> AOT425StatPgm pada pengamatan 7 hari ulangan IV	88
Lampiran 10.	Hasil pengujian toksisitas akut oral Berdasarkan <i>software</i> AOT425StatPgm pada pengamatan 7 hari ulangan V.....	89
Lampiran 11.	Hasil pengujian toksisitas akut oral berdasarkan <i>software</i> AOT425StatPgm pada pengamatan 14 hari	90
Lampiran 12.	<i>Log book</i> suhu dan kelembapan ruangan ketika uji toksisitas akut metode OECD 425.....	91
Lampiran 13.	Surat izin melakukan penelitian di laboratorium toksikologi Pusarpedal-KLH	92
Lampiran 14.	Surat izin melakukan penelitian di laboratorium Patologi BBPMSOH.....	93
Lampiran 15.	Sertifikat analisis tembaga (II) sulfat pentahidrat dari Wako Pure Chemical Industries, Ltd	94
Lampiran 16.	Sertifikat hewan uji.....	95
Lampiran 17.	Cara pengukuran diameter vena sentralis dan Glomerulus	96

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kegiatan pembangunan umumnya bertujuan meningkatkan kesejahteraan hidup rakyat dan dilaksanakan melalui rencana pembangunan jangka panjang yang bertumpu pada pembangunan di bidang industri. Hal ini bisa dilihat dari pertumbuhan industri yang terjadi selama tahun 2010. Data Kementerian Perindustrian menunjukkan pertumbuhan industri pada triwulan II tahun 2010 telah mencapai 4,91%. Angka ini lebih tinggi dari target pertumbuhan industri yang ditetapkan sebesar 4,65% untuk seluruh tahun 2010 (Kementerian Perindustrian Republik Indonesia, 2010).

Pembangunan di bidang industri dapat bermanfaat bagi kesejahteraan hidup rakyat, tetapi di lain pihak, kegiatan industri tersebut juga akan menghasilkan limbah. Diantara limbah yang dihasilkan oleh kegiatan industri tersebut terdapat limbah bahan berbahaya dan beracun (limbah B3). Limbah B3 yang dibuang langsung ke dalam lingkungan dapat menimbulkan bahaya terhadap lingkungan dan kesehatan manusia serta makhluk hidup lainnya. Oleh karena itu, pemerintah membuat suatu regulasi tentang pengelolaan limbah B3 dengan memeriksa setiap limbah yang dihasilkan oleh industri (Peraturan Pemerintah Nomor 18, 1999).

Pada umumnya, sebelum dibuang ke lingkungan, limbah industri akan diuji secara kimia untuk mengetahui apakah konsentrasi senyawa-senyawa kimia yang terdapat didalam limbah tersebut berada dibawah baku mutu yang dipersyaratkan dalam peraturan perundang-undangan yang berlaku. Pengujian secara kimia ini dikenal dengan istilah *chemical-specific approach* (Whitehouse P, 2001). Kelemahan *chemical-specific approach* adalah karakteristik limbah yang terdiri dari berbagai macam campuran bahan baku dan pereaksi sehingga mengakibatkan kesulitan dalam mengukur konsentrasi seluruh senyawa kimia yang mungkin ada didalam limbah. Pada tahun 1984, *United States Protection Agency* (US EPA) mengeluarkan suatu metode pengujian berdasarkan efek toksik

yang terdapat dalam limbah. Pendekatan tersebut dikenal dengan *toxicity-based approach* (Jin H, Yang X, Yin D & Yu H, 1999).

Menurut Peraturan Pemerintah No. 18 tahun 1999 juncto No. 85 tahun 1999 tentang Pengolahan Limbah B3, uji toksikologi merupakan uji terakhir yang dilakukan apabila limbah tidak terdapat dalam daftar sumber spesifik dan dibawah baku mutu uji karakteristik dari uji TCLP (*Toxicity Characteristic Leaching Procedure*). Uji toksisitas digunakan untuk mengetahui sifat racun akut dan kronis suatu senyawa. Dengan uji ini, dapat diketahui pengaruh senyawa kimia atau zat pencemar terhadap organisme yang diuji (William dan Burson, 1995). Salah satu uji toksikologi yang dipersyaratkan dalam Peraturan Pemerintah tersebut adalah dengan penentuan sifat akut limbah melalui uji hayati untuk mengukur hubungan dosis-respons antara limbah dengan kematian hewan uji, untuk menetapkan nilai LD₅₀.

Di Indonesia, hingga saat ini belum ada laboratorium toksikologi dan metode uji toksisitas akut limbah yang terakreditasi oleh Komite Akreditasi Nasional (KAN). Oleh karena itu, Pusarpedal sebagai unit teknis Kementerian Lingkungan Hidup dan laboratorium rujukan nasional di bidang lingkungan hidup berusaha mempersiapkan laboratorium toksikologi beserta metode uji toksisitas akut limbah yang sesuai guna memenuhi Peraturan Pemerintah No. 18 tahun 1999 juncto No. 85 Tahun 1999 tentang Pengelolaan Limbah Bahan berbahaya dan Beracun (Pusarpedal, 2011).

Organization for Economic Cooperation & Development (OECD) merupakan salah satu organisasi yang sudah mengeluarkan prosedur standar pengujian toksisitas lingkungan secara internasional, didirikan pada tahun 1948 dan beranggotakan 31 negara yang dipimpin oleh Amerika Serikat dan Eropa. Dari beberapa metode uji toksisitas akut yang dikeluarkan oleh OECD, metode penentuan toksisitas akut yang banyak digunakan adalah metode OECD 425 (*Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*) karena menggunakan lebih sedikit hewan uji (maksimal delapan hewan uji tiap pengujian), serta menggunakan *software* untuk menghitung nilai LD₅₀ (Rispin *et al.*, 2001).

Validasi metode perlu dilakukan oleh laboratorium terhadap metode non standar, metode yang dikembangkan sendiri, metode standar yang dimodifikasi,

dan metode standar untuk mempertegas dan mengkonfirmasi bahwa metode tersebut sesuai dengan penggunaannya. Hasil validasi metode selain untuk mendukung pengujian sesuai peraturan perundang-undangan lingkungan hidup yang berlaku serta hasil yang diperoleh diharapkan dapat sebagai bahan rumusan Standar Nasional Indonesia (SNI) (Hadi, 2007).

Pada penelitian ini dilakukan pengujian terhadap *reference toxicant* yang direkomendasikan dalam pengujian toksisitas oleh *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) untuk penjaminan kualitas (USEPA, 2002b). Tembaga (II) sulfat pentahidrat dipilih sebagai *reference toxicant* karena tembaga termasuk kedalam daftar limbah bahan berbahaya dan beracun (B3), namun penggunaan tembaga (II) sulfat pentahidrat dalam lingkungan juga sebagai fungisida, herbisida, algasida, dan bahan tambahan untuk penyubur tanaman (Sinkovic A, Strdin A, Svensek F, 2008). Tembaga (II) sulfat pentahidrat juga diberikan secara langsung pada hewan ternak sebagai tambahan pakan (Arifin, 2007).

Berdasarkan hal-hal di atas, maka dilakukan validasi metode uji toksisitas akut yang dikeluarkan oleh OECD di laboratorium Toksikologi Pusarpedal. Penelitian dilakukan pada sejumlah hewan uji mencit betina galur DDY yang diberi larutan *reference toxicant* tembaga (II) sulfat pentahidrat. Penentuan nilai LD₅₀ dilakukan menggunakan *software Acute Oral Toxicity (Guideline 425) Statistical Program* (AOT425StatPgm). Data histologi hati dan ginjal mencit setelah perlakuan dengan *reference toxicant* juga diperlukan sebagai data pendukung (OECD,2001a). Validasi dilakukan dengan melihat akurasi dan presisi dari hasil pengujian. Dengan penelitian ini, diharapkan dapat diperoleh metode uji toksisitas akut yang tervalidasi di Indonesia.

1.2 Perumusan Masalah dan Ruang Lingkup

Masalah yang diangkat dalam penelitian adalah belum adanya metode uji toksisitas akut limbah yang tervalidasi di Indonesia. Oleh karena itu, dilakukan pengkajian tentang metode uji toksisitas akut 425 yang dipublikasikan oleh OECD menggunakan Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat. Ruang lingkup penelitian ini adalah Toksikologi Lingkungan (*Environmental Toxicology*).

1.3 Jenis Penelitian dan Metode yang Digunakan

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengujian toksisitas akut oral metode OECD 425 menggunakan tembaga (II) sulfat pentahidrat sebagai *reference toxicant*.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk:

1. Menganalisis apakah metode OECD 425 tersebut memenuhi persyaratan validasi yaitu akurasi dan presisi serta dapat digunakan sebagai metode standar pengujian toksisitas akut limbah di Indonesia.
2. Menganalisis apakah mencit betina dapat digunakan sebagai hewan uji untuk uji toksisitas akut metode OECD 425.
3. Menganalisis apakah ada perbedaan hasil antar pengamatan 7 hari dan 14 hari dalam uji toksisitas akut metode OECD 425.
4. Menganalisis gambaran histologi ginjal dan hati mencit setelah uji toksisitas akut menggunakan *reference toxicant*.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat memberikan data awal uji toksisitas akut kepada Kementerian Lingkungan Hidup dalam rangka Revisi Peraturan Pemerintah No. 18 jo. Peraturan Pemerintah No. 85 Tahun 1999 tentang Pengelolaan Limbah Bahan Berbahaya dan Beracun (B3).

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah proses di mana suatu metode ditetapkan melalui serangkaian uji laboratorium untuk mengetahui bahwa parameter metode yang diuji memenuhi persyaratan untuk penerapan metode yang dimaksud. Tujuan utama validasi adalah untuk menjamin metode analisis yang digunakan mampu memberikan hasil yang cermat, handal, dan dapat dipercaya. Dalam ISO/IEC 17025:2005, parameter metode analisis adalah kecermatan (akurasi), reipitabilitas (presisi), selektivitas, linearitas, rentang, batas kuantitasi (LOQ) dan batas deteksi (LOD), ketangguhan, dan kekuatan (Horwitz, 1975; Hadi, 2007).

2.1.1 Akurasi

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Biasanya dinyatakan sebagai persen perolehan kembali atau *recovery*. Cara untuk menentukan kecermatan dalam ISO/IEC 17025:2005 adalah dengan pengujian menggunakan CRM (*Certified Reference Material*) setidaknya dilakukan 7 kali pengulangan analisis tiap CRM. Kriteria akurat diberikan jika hasil analisis memberikan nilai antara 98%-102%. Untuk sampel biologis dan nabati, syarat akurasi yang baik adalah $\pm 10\%$ dari syarat akurasi untuk sediaan (98%-102%) (Fifield & Kealey, 2000; Hadi, 2007).

2.1.2 Presisi

Reipitabilitas atau presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual yang diukur melalui penyebaran hasil individu dari hasil rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen (Ganjar & Rohman, 2007). Cara untuk menentukan reipitabilitas dalam ISO/IEC 17025:2005 adalah dengan pengujian sampel setidaknya dilakukan 7 kali pengulangan analisis tiap sampel (Hadi, 2007).

2.1.3 Selektivitas

Yang dimaksud dengan selektivitas suatu metode adalah kemampuan dari metode tersebut untuk mengukur analit tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada di dalam matriks sampel. Selektivitas sering kali dinyatakan sebagai derajat penyimpangan metode yang dilakukan terhadap sampel dengan penambahan cecaran, hasil urai, senyawa sejenis, atau senyawa asing lain ke dalamnya. Hasil dari sampel tersebut dibandingkan dengan hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan (Fifield & Kealey, 2000).

2.1.4 Linearitas

Yang dimaksud dengan linearitas adalah kemampuan metode analisis untuk memberikan respon secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematika yang baik dan proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linearitas dapat diperoleh dengan mengukur konsentrasi standar yang berbeda, minimal lima konsentrasi. Data yang diperoleh kemudian diproses menggunakan regresi linier, sehingga diperoleh nilai *slope*, intersep, dan koefisien korelasi. Nilai koefisien korelasi di atas 0,9990 sangat diharapkan untuk suatu metode analisis yang baik. Selain koefisien korelasi, simpangan baku residual (S_y) juga harus dihitung. Semua perhitungan matematika tersebut dapat diukur dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer (Anderson, 1999).

2.1.5 Rentang (*Range*)

Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (Burgess, 2000).

2.1.6 Batas Kuantitasi (LOQ) dan Batas Deteksi (LOD)

Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi adalah jumlah analit terkecil dalam sampel

yang masih dapat dideteksi dan masih memberikan respon yang signifikan bila dibandingkan dengan blanko (Khopkar, 1990).

2.1.7 Reprodusibilitas (*Ruggedness*)

Dalam ISO/IEC 17025:2005, pengujian reprodusibilitas dilakukan oleh operator yang berbeda (biasanya melalui uji banding antar laboratorium). Pengulangan pengujian dilakukan oleh analis yang berbeda, laboratorium yang berbeda, dan menggunakan peralatan yang berbeda (Hadi, 2007).

2.1.8 Ketahanan (*Robustness*)

Untuk validasi ketahanan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus-menerus, mengevaluasi respon analitik, dan efek pada presisi dan akurasi. Identifikasi sekurang-kurangnya tiga faktor analisis yang dapat mempengaruhi hasil bila nanti diubah atau diganti (Burgess, 2000).

2.1.9 Validasi Metode Uji Toksisitas

Parameter validasi dibidang pengujian toksikologi lingkungan, hanya memungkinkan untuk dilakukan uji akurasi dan presisi. Kriteria validasi untuk uji toksikologi mencakup (NIEHS, 1997) :

- a. Ketersediaan data mengenai alasan penggunaan dan tujuan metode;
- b. Hubungan *end point* kepada efek biologis hewan uji harus dideskripsikan pada pembahasan hasil pengujian;
- c. Ketersediaan protokol yang jelas dari metode uji dan harus mencakup deskripsi dari senyawa uji yang digunakan, bagaimana metode tersebut dilakukan, tersedia kontrol positif maupun kontrol negatif, deskripsi mengenai pengolahan dan analisa data, serta deskripsi mengenai *limit/* batas uji;
- d. Evaluasi mengenai presisi metode uji di laboratorium tempat dilangsungkannya penelitian;
- e. Pada pelaksanaan uji, harus digunakan *reference toxicant* yang telah diketahui data toksikologinya;

- f. Keterbatasan penelitian harus dicantumkan pada hasil pengujian dengan metode tersebut;

2.2 Toksisitas

Suatu keadaan yang menandai adanya efek toksik atau racun yang terdapat pada suatu bahan sebagai sediaan dosis tunggal atau campuran, dapat diartikan sebagai toksisitas (Hodgson, 2010). Untuk mengetahui tingkat toksisitas terhadap organisme hidup dapat dilakukan cara uji hayati atau uji toksisitas. Uji hayati adalah percobaan yang menggunakan organisme hidup untuk mengetahui/mengukur adanya pengaruh dari suatu senyawa, limbah, faktor lingkungan dan kombinasi lainnya (APHA, 1975). Dengan uji ini dapat diketahui pengaruh senyawa kimia/zat pencemar (daya racun dan efek samping) terhadap organisme yang diuji, misalnya:

- a. Hambatan pada pertumbuhan,
- b. Tingkat kematian serta gambaran informasi gejala lain seperti perubahan perilaku,
- c. Abnormalitas fungsi organ tubuh,
- d. Gangguan-gangguan fisiologis lainnya.

Informasi tersebut dapat digunakan secara analog untuk mengetahui bagaimana pengaruh limbah beracun terhadap manusia (Klaassen & Doull 1996).

Uji toksisitas dapat digunakan sebagai suatu penelitian dasar untuk mendeteksi, mengevaluasi, dan mengurangi pengaruh pencemaran. Kegunaan uji toksisitas ini erat sekali hubungannya dengan penentuan toksisitas buangan industri dan untuk mengetahui efisiensi pengolahan limbah industri. Selain itu, uji toksisitas ini dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan dalam menentukan suatu baku mutu kualitas lingkungan terhadap senyawa/limbah. Umumnya pencantuman batas toksisitas (LC_{50} dan LD_{50}) dalam peraturan yang dibuat, ditujukan untuk melindungi lingkungan (Yossa, 2008).

Uji toksisitas terdiri atas dua jenis, yaitu uji toksisitas umum dan uji toksisitas khusus. Uji toksisitas umum dirancang untuk mengevaluasi keseluruhan efek umum suatu obat pada hewan uji melalui uji toksisitas akut, subakut/subkronis, kronis. Uji toksisitas khusus dirancang untuk mengevaluasi

dengan rinci tipe toksisitas secara khusus, seperti uji teratogenik, uji mutagenik, dan uji karsinogenik (Lu, 2009).

Langkah pertama yang biasa digunakan dalam penentuan keamanan suatu zat kimia/zat pencemar terhadap organisme adalah uji toksisitas dengan menentukan nilai LD₅₀ (*median lethal dose*), yaitu suatu uji sederhana dari tingkatan toksisitas suatu zat/bahan/senyawa terhadap hewan uji yang diteliti. Uji ini telah diterima oleh para ilmuwan pada umumnya (Lu, 2009). Berdasarkan penentuan nilai LD₅₀ oral, telah diklasifikasikan tingkat toksisitas seperti tertera pada Tabel 2.1 terkait dengan bahaya yang disebabkan oleh zat kimia/bahan/senyawa (Lu, 2009).

Tabel 2.1. Klasifikasi tingkat toksisitas zat kimia/bahan/senyawa berdasarkan nilai LD₅₀

Tingkat Toksisitas	Kriteria Toksik	LD ₅₀ Oral (mg/kg bb)
1	Sangat beracun (<i>Extremely Toxic</i>)	<1
2	Berdaya racun kuat (<i>Highly Toxic</i>)	1 – <50
3	Beracun (<i>Toxic</i>)	50 – <500
4	Berdaya racun lemah (<i>Slightly Toxic</i>)	500 – <5000
5	Hampir tidak beracun (<i>Practically non Toxic</i>)	5000 – <15000
6	Relatif tidak membahayakan (<i>Relatively harmless</i>)	>15000

[Sumber: Yossa, 2008]

2.2.1 Toksisitas Akut

Efek toksik suatu senyawa yang akan terjadi dalam waktu yang singkat setelah pemajanan atau pemberiannya dengan takaran tertentu dapat ditentukan dengan uji toksisitas akut. Uji ini dikerjakan dengan cara memberikan dosis tunggal senyawa uji pada hewan uji. Suatu senyawa diberikan melalui jalur yang akan digunakan oleh manusia atau jalur yang memungkinkan manusia terpajani dengan senyawa tersebut. Biasanya pengamatan dilakukan selama 24 jam, kecuali pada kasus tertentu selama 3-14 hari. Pengamatan tersebut meliputi gejala-gejala klinis, jumlah hewan yang mati, histopatologi organ (Loomis, 2001; Sinta, 2007).

Data kuantitatif yang diperoleh dari uji toksisitas akut ini adalah LD₅₀, sedangkan data kualitatifnya berupa penampakan klinis dan morfologis efek

toksik senyawa uji. Data LD₅₀ yang diperoleh dapat digunakan untuk mengetahui potensi ketoksikan akut senyawa relatif terhadap senyawa lain. Selain itu, juga dapat digunakan untuk memperkirakan takaran dosis uji toksikologi lainnya (Donatus, 2001).

2.3 Metode Uji Toksisitas Akut *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD)

Beberapa metode uji toksisitas akut oral untuk senyawa kimia telah dipublikasikan oleh OECD. Masing-masing metode yang dikeluarkan oleh OECD memiliki kelebihan dan keterbatasan (Sitzel. K & Carr. G, 1999). Berikut dijabarkan masing-masing metode uji toksisitas akut oral OECD:

2.3.1 Metode Standar OECD 401 *Acute Oral Toxicity* (AOT)

Pedoman uji toksisitas akut oral yang pertama kali dikeluarkan oleh OECD adalah pedoman nomor 401 (*Acute Oral Toxicity*). Prinsip uji toksisitas akut oral OECD 401 adalah mengelompokkan hewan uji dengan jenis kelamin yang sama ke dalam beberapa kelompok dosis yang telah ditetapkan. Setiap kelompok terdiri dari 5 hewan uji dengan jenis kelamin yang sama. Pemberian dosis dilakukan secara oral dan dengan dosis yang bertingkat untuk setiap kelompok. Setelah uji selesai, dilakukan uji kembali dengan hewan uji dari jenis kelamin berbeda (OECD, 1987; Sitzel & Carr, 1999).

Sebagai uji toksisitas akut oral yang masih tradisional, LD₅₀ dari senyawa uji ditentukan dari dosis yang memberikan 50% kematian pada hewan uji. Metode penentuan LD₅₀ pun mengikuti metode dari Bliss, Litchifield & Wilcoxon, Finney, Weil, Thompson, maupun Miller & Tainter. Kurva dosis respon dapat dilinearkan dengan persen respon untuk log dosis ke dalam grafik probit (OECD, 1987; Sitzel & Carr, 1999).

Hewan uji yang digunakan adalah tikus atau mencit (rodentia) dengan jenis kelamin yang sama. Setidaknya menggunakan 5 hewan uji untuk masing-masing kelompok dosis.

Kelemahan dari metode ini adalah menggunakan banyak hewan uji (minimal 20 hewan uji untuk setiap uji senyawa) sehingga metode ini sudah

dihapuskan oleh OECD pada Desember 2002 dan tidak lagi digunakan (Schelde, Elke, Gisela, & Detlev, 2005).

2.3.2 Metode Standar OECD 420 *Fixed Dose Procedure* (FDP)

Pada tahun 2001, beberapa metode uji toksisitas akut oral untuk menggantikan metode OECD 401 telah dipublikasikan oleh OECD. Salah satu metode yang dipublikasikan oleh OECD adalah pedoman nomor 420 (*Fixed Dose Procedure*). Metode standar OECD 420 ini pertama kali diusulkan oleh *British Toxicology Society* pada tahun 1984 sebagai alternatif untuk menggantikan metode OECD 401 (Barile, 2008).

Prinsip uji toksisitas akut oral OECD 420 adalah mengelompokkan hewan uji dengan jenis kelamin yang sama ke dalam beberapa kelompok dosis yang telah ditetapkan yaitu 5, 50, 300 dan 2000 mg/kg dengan 5 hewan uji tiap kelompok (OECD, 2001c; Sitzel & Carr, 1999). Sebelum dilakukan uji utama, dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu untuk menentukan dosis awal menggunakan satu hewan uji pada tiap dosis. Hewan uji yang digunakan adalah tikus atau mencit (rodentia) dengan jenis kelamin betina. Hewan uji jantan tidak diikutsertakan karena menurut beberapa penelitian menyatakan bahwa hewan uji betina (tikus maupun mencit) lebih sensitif dalam pengujian (OECD, 2001a,b,c). Setidaknya menggunakan 5 hewan uji untuk masing-masing kelompok dosis namun dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu.

Dosis yang diberikan pun sudah ditetapkan yaitu 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg bb (OECD, 2001b). Nilai LD₅₀ ditentukan dengan rentang dosis (bukan merupakan suatu nilai pasti) (Sitzel & Carr, 1999; Barile, 2008).

Metode OECD 420 ini memberikan informasi tentang senyawa berbahaya (*hazardous*) dan senyawa tersebut dikelompokkan sesuai dengan klasifikasi dari GHS (*Globally Harmonized System*) atau di Indonesia berada dalam pengelompokan limbah B3 (OECD, 2001c; Yossa, 2008). Pada metode ini, digunakan lebih sedikit hewan uji dan rasa sakit yang ditimbulkan lebih sedikit bagi hewan uji dibanding metode uji LD₅₀ konvensional OECD 401 (Barile, 2008).

2.3.3 Metode Standar OECD 423 *Acute Toxic Class Method* (ATC)

Pada tahun 2001, OECD mengeluarkan pedoman uji toksisitas akut oral yang lain yaitu OECD 423 sebagai alternatif untuk uji toksisitas akut oral yang dapat menggantikan metode 401 (Schelde, Elke, Gisela, & Detlev, 2005; OECD 2001c).

Prinsip dari metode toksisitas akut oral ini adalah hewan uji yang digunakan lebih sedikit (3 hewan uji dengan jenis kelamin yang sama tiap tahap uji) dan menggunakan kematian hewan uji sebagai *endpoint* (Barile, 2008).

Kelompok hewan uji (3 hewan uji) diberikan dosis awal dan dilihat respon kematian dan respon fisiologisnya. Pemberian dosis selanjutnya mengikuti respon dari hewan uji yang diberikan dosis awal. Jika jumlah hewan uji yang mati lebih dari satu, maka dosis untuk uji berikutnya diturunkan, begitupun sebaliknya (OECD, 2001c).

Sebelum dilakukan uji utama, dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu untuk menentukan dosis awal menggunakan satu hewan uji pada tiap dosis. Hewan uji yang digunakan adalah tikus atau mencit (rodentia) dengan jenis kelamin betina. Hewan uji jantan tidak diikutsertakan karena menurut beberapa penelitian menyatakan bahwa hewan uji betina (tikus maupun mencit) lebih sensitif dalam pengujian (OECD, 2001a,b,c). Setidaknya menggunakan 3 hewan uji untuk masing-masing kelompok dosis namun dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu.

Dosis yang diberikan pun sama dengan dosis pada pedoman OECD 420 yaitu 5, 50, 300, dan 2000 mg/ kg bb. Perbedaannya hanya pada jumlah mencit tiap dosis (OECD, 2001b,c). Nilai LD₅₀ ditentukan dari jumlah hewan uji yang mati pada kelompok dosis yang diberikan.

2.3.4 Metode Standar OECD 425 *Up-and-Down Procedure* (UDP)

Dalam metode standar OECD 425, hewan uji diberi seri dosis dengan faktor pengalihan 3,2 dan dosis yang dipilih harus berada dalam jarak LD₅₀ dari acuan. Pengamatan atas respon hewan uji dan kematian hewan uji dilakukan hingga 14 hari setelah pemberian dosis (OECD, 2001a; USEPA, 2002a; Barile, 2008). Hewan uji yang digunakan adalah tikus atau mencit (rodentia) dengan jenis

kelamin betina. Hewan uji jantan tidak diikutsertakan karena menurut beberapa penelitian menyatakan bahwa hewan uji betina (tikus maupun mencit) lebih sensitif dalam pengujian (OECD, 2001a,b,c). Setidaknya menggunakan 1 hewan uji untuk masing-masing dosis.

Pemberian dosis selanjutnya dilakukan berdasarkan status dosis sebelumnya setelah 48 jam. Jika hewan uji hidup, maka dosis selanjutnya dinaikkan dengan faktor kenaikan 3,2. Jika hewan uji mati, maka dosis selanjutnya diturunkan dengan faktor penurunan 3,2. Uji dihentikan bila memenuhi kriteria (Lampiran 1):

- a. Tiga hewan hidup pada batas atas uji (5000 mg/kg);
- b. Lima pengulangan muncul pada 6 hewan yang diujikan. Dimulai dari dosis terendah saat ditemukan hewan uji yang hidup, setelah itu dilakukan uji pada konsentrasi diatas dosis terendah tersebut dan uji pada kedua konsentrasi ini dilakukan sebanyak 2x (*vice versa*);
- c. Penghentian dihentikan jika ditemukan 3x kematian pada 4 konsentrasi yang sama.

Nilai LD_{50} ditentukan dengan program AOT425StatPgm. AOT425StatPgm (*Acute Oral Toxicity (Guideline 425) Statistical Program*) adalah perangkat lunak untuk menghitung nilai LD_{50} . Tujuan dari prosedur ini adalah untuk menguji toksisitas jangka pendek dari suatu senyawa kimia yang diberikan pada hewan pengerat. Informasi yang dimasukkan ke dalam aplikasi AOT425StatPgm adalah dosis dan respon hewan uji (mati/hidup). Prosedur perhitungan LD_{50} dengan AOT425StatPgm berlangsung secara bertahap. Pengguna aplikasi AOT425StatPgm dapat memasukkan hasil uji untuk satu hewan uji, menyimpan data, dan memasukkan data kembali untuk hewan uji kedua pada hari yang berbeda. Ketika seluruh uji selesai, program AOT425StatPgm menggunakan hasil tersebut untuk menghitung LD_{50} .

Kelebihan dari Program AOT425StatPgm adalah dapat menghitung dosis rekomendasi untuk hewan berikutnya, kapan waktu untuk menghentikan pemberian dosis hewan, dan estimasi statistik LD_{50} (Westat, 2001).

Pada limbah yang belum diketahui nilai LD_{50} nya, maka dosis yang diberikan ke hewan uji mengikuti faktor kelipatan dosis dari OECD yaitu 1,75;

5,5; 17,5; 55; 175; 550; 1750; 5000 mg/kg bb (OECD 2001a; Rispin *et al.* 2002; USEPA 2002a).

Tabel 2.2. Perbedaan metode uji toksisitas akut oral yang dikeluarkan oleh OECD

Kriteria	OECD 401 “AOT”	OECD 420 “FDP”	OECD 423 “ATC”	OECD 425 “UDP”
Jenis Kelamin Hewan Uji	Rodentia, jenis kelamin sama	Rodentia, jenis kelamin betina	Rodentia, jenis kelamin betina	Rodentia, jenis kelamin betina
Jumlah Hewan Uji	Minimal 20. 5 hewan uji masing-masing kelompok dosis	5 hewan uji masing-masing kelompok dosis	3 hewan uji masing-masing kelompok dosis	Maksimal 8 hewan uji. 1 hewan uji tiap pemberian dosis.
Dosis	Maksimal 2000 mg/kg bb	Kelompok dosis 5, 50, 300, dan 2000 mg/ kg bb	Kelompok dosis 5, 50, 300, dan 2000 mg/ kg bb	Mengikuti faktor pengalihan 3,2. Dosis maksimal 2000 mg/kg bb atau 5000 mg/kg bb
Masa berlaku metode	Dihapuskan tahun 2002	Masih berlaku	Masih berlaku	Masih berlaku
<i>End point</i>	Kematian hewan uji	Kematian hewan uji	Kematian hewan uji	Kematian hewan uji (48 jam) & Hewan uji yg hidup (48 jam)
Pengamatan hewan uji	Perubahan berat badan, gejala toksisitas, patologi	Perubahan berat badan, gejala toksisitas, patologi	Perubahan berat badan, gejala toksisitas, patologi	Perubahan berat badan, gejala toksisitas, patologi

[Sumber: OECD, 2001a,b,c, telah diolah kembali]

2.4 Reference Toxicant

Kualitas untuk seluruh uji toksisitas ditentukan dengan melakukan uji dengan menggunakan *reference toxicant* untuk memonitor variasi *inter-batch*

dalam respon hewan uji untuk sesama toksikan. Uji dengan *reference toxicant* digunakan untuk memeriksa kesehatan dan sensitivitas hewan uji dari *batch* yang berbeda, dan untuk mendeterminasi reproduibilitas hasil uji dari waktu ke waktu (USEPA, 2002b; ASTM, 1980).

Respon dari populasi uji sebagai variabel yang sudah diketahui dan kontrol positif ditentukan dengan *reference toxicant*. Pengujian dengan *reference toxicant* direkomendasikan dalam uji toksisitas oleh *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) untuk penjaminan kualitas (USEPA, 2002b). Sensitivitas dan kesehatan hewan uji dapat diprediksi dengan adanya *reference toxicant* serta juga dapat digunakan untuk membandingkan pencapaian yang berbeda dari hewan uji dengan hasil dari laboratorium (Jop *et al*, 1986).

Karakteristik *reference toxicant* yang ideal dijabarkan oleh Lee (1980) dan mencakup toksisitas umum, kelarutan, persistensi dan stabilitas, toksisitas pada konsentrasi rendah, dosis mematikan, dan dosis yang dapat dihitung dan dikuantifikasi. Banyak senyawa yang sudah digunakan sebagai *reference toxicant* termasuk kromium, kadmium, natrium klorida (NaCl), kalium klorida (KCl), kadmium klorida (CdCl₂), tembaga sulfat (CuSO₄), natrium dodesil sulfat (SDS), dan kalium dikromat (K₂Cr₂O₇) (Lee, 1980; USEPA, 2002b).

Pengujian dengan *reference toxicant* harus memenuhi dua tujuan; yaitu mengevaluasi sensitivitas hewan uji, dan untuk menguji performa metode di laboratorium. Kedua tujuan tersebut dapat dicapai bersamaan dengan setiap *batch* dari sampel yang diujikan pada waktu yang sama dalam laboratorium. Pengujian *reference toxicant* secara bersamaan tersebut, adalah satu-satunya metode yang menghasilkan kontrol positif yang sebenarnya untuk uji toksisitas (USEPA, 2002b).

Hasil uji dengan *reference toxicant* diplot ke dalam grafik yang disebut *control chart* yang memplot LD₅₀ dari *batch* yang berbeda dalam 1 spesies hewan uji dengan 1 *reference toxicant* dari waktu ke waktu dan dibandingkan dengan batas dari *control chart*. Batas dari *control chart* menggunakan mean \pm dua standar deviasi, dan minimum 5 data untuk membuat sebuah *control chart*. Dua standar deviasi dibawah mean adalah *lower control limit* (LCL), dan dua standar deviasi diatas mean adalah *upper control limit* (UCL). Respon hewan uji yang

baik harus berada dalam jarak antara LCL dan UCL (USEPA, 2002c; Gad & Changelis, 1990).

2.5 Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat

Menurut Ganiswara (1995), Tembaga (Cu) merupakan mikroelemen esensial bagi tubuh. Oleh karena itu, tembaga harus selalu ada di dalam makanan. Hal yang perlu diperhatikan adalah menjaga agar kadar tembaga di dalam tubuh tidak berkurang dan juga tidak berlebihan. Kebutuhan tubuh per hari akan tembaga adalah 0,05 mg/kg berat badan. Pada kadar tersebut tidak terjadi akumulasi tembaga (Cu) pada tubuh manusia normal.

Dalam industri, tembaga banyak digunakan dalam industri cat dan fungisida. Pada bahan makanan, cemaran logam tembaga (Cu) dapat terjadi akibat penggunaan pestisida secara berlebihan (Dewi, 2011).

Tembaga (Cu) bersifat racun terhadap semua tumbuhan pada konsentrasi larutan di atas 0,1 ppm dan bersifat racun bagi domba pada konsentrasi di atas 20 ppm. Konsentrasi Cu yang aman bagi air minum manusia tidak lebih dari 1 ppm.. Konsentrasi normal komponen ini di tanah berkisar 20 ppm dengan tingkat mobilitas sangat lambat karena ikatan yang sangat kuat dengan material organik dan mineral tanah liat. Kehadiran tembaga pada limbah industri biasanya dalam bentuk ion bivalen Cu(II) sebagai *hydrolitic product*. Beberapa industri seperti pewarnaan, kertas, minyak, industri pelapisan melepaskan sejumlah tembaga yang tidak diharapkan. Tembaga dalam konsentrasi tinggi (22-750 mg/kg tanah kering) dijumpai pada sedimen di laut Hongkong dan pada sejumlah pelabuhan-pelabuhan di Inggris (Widaningrum, Miskiyah & Suismono, 2007).

Adanya tembaga (Cu) dalam jumlah yang besar dalam tubuh dapat menyebabkan gejala-gejala yang akut. Keracunan tembaga dapat menyebabkan gangguan pencernaan seperti sakit perut, mual, muntah, dan diare, serta gangguan sistem peredaran darah. Beberapa kasus yang parah dapat menyebabkan gagal ginjal dan kematian (Darmono, 1995).

Tembaga (II) sulfat atau garam tembaga baik yang dilarutkan maupun tidak dilarutkan dipakai luas dalam bidang pertanian sebagai bahan insektisida (Adiwisastro, 1985). Tembaga sulfat digunakan sebagai *reference toxicant* karena

tembaga memenuhi banyak karakteristik dari *reference toxicant* yang ideal yaitu: kelarutan, toksisitas pada konsentrasi rendah, kematian cepat (*rapid lethality*), dan dapat dihitung dan dikuantifikasi (Lee, 1980).

Dalam *Material Safety Data Sheet* yang dikeluarkan oleh Wako Chemicals, diketahui LD₅₀ akut oral tembaga (II) sulfat adalah 960 mg/kg pada tikus dan 2000 mg/kg dermal pada tikus. Sedangkan dari literatur, LD₅₀ akut oral tembaga (II) sulfat juga sebesar 960 mg/kg bb tikus (WHO Food Additives Series 17, 2012). Konsentrasi tembaga yang diperbolehkan berada di lingkungan dalam Peraturan Pemerintah No. 85 Tahun 1999 adalah 10,0 mg/l.

2.5.1 Metabolisme Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat

Tembaga yang mungkin terdapat dalam makanan melalui saluran pencernaan diserap dan diangkut melalui darah. Segera setelah masuk peredaran darah, unsur tembaga akan berikatan dengan protein albumin kemudian diantarkan dan dilepaskan ke jaringan-jaringan di hati dan ginjal lalu berikatan dengan protein membentuk enzim-enzim, terutama enzim seruloplasmin yang mengandung 90-94% tembaga dari total kandungan tembaga dalam tubuh. Ekskresi utama unsur ini ialah melalui empedu, sedikit bersama air seni dan dalam jumlah yang relatif kecil bersama keringat dan air susu. Jika terjadi gangguan-gangguan pada rute pembuangan empedu, unsur ini akan diekskresi bersama air seni (Inoue Y, Osawa, Matsui, Asai, Murakami, Matsui, Yano, 2002).

2.5.2 Gejala Toksisitas oleh Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat

Dalam penentuan toksisitas akut metode standar OECD 425, diperlukan adanya pengamatan fisiologis dan gejala intoksikasi dari senyawa yang diujikan. Secara umum, gejala toksisitas tembaga sulfat adalah muntah yang disebabkan iritasi lokal dan aksi ion tembaga pada lambung dan usus. Muntah biasanya setelah 5 menit sampai dengan 10 menit (dalam keadaan lambung kosong), tetapi bila lambung sedang penuh dengan makanan, maka muntah akan terjadi antara 0,5 jam sampai satu jam lebih (Adiwisastro, 1985).

Gejala keracunan akut tembaga sulfat antara lain rasa terbakar di mulut dan tenggorokan, muntah, diare berdarah dan berair, tenesmus, hemolisis,

hematuria, anuria, kerusakan hati dengan ikterus, hipotensi, kolaps dan konvulsi (Dreisbach, 1982).

Keracunan oleh tembaga menunjukkan sifat-sifat yang agak kurang beracun dibandingkan dengan logam berat lainnya yang dapat meluas terhadap kerusakan serabut-serabut darah (kapiler), kerusakan ginjal, dan diikuti pula dengan depresi (Adiwisastro, 1985).

2.6 Hati

2.6.1 Anatomi dan Fisiologi Hati

Organ hati merupakan organ tubuh terbesar yaitu sekitar 2% dari berat tubuh manusia dewasa. Organ hati terlibat dalam metabolisme zat makanan serta sebagian besar obat dan toksikan. Secara keseluruhan bentuk hati setiap spesies tidak identik. Pada tikus dan mencit, hati terbagi atas beberapa lobus, sedangkan pada hati manusia hati hanya terbagi dalam dua lobus saja. Hati terletak dibawah diafragma dan diselimuti oleh kapsul tipis yang secara mekanik berfungsi untuk melekatkan hati pada diafragma. Kira-kira 80% darah yang masuk ke hati berasal dari vena porta dan sekitar 20% sisanya berasal dari arteri hepatic (Lu, 2009).

Unsur utama struktur hati adalah sel-sel hati atau hepatosit yang bertanggung jawab terhadap peran sentral hati dalam metabolisme. Sel-sel hati berkelompok dalam susunan-susunan yang saling berhubungan sedemikian rupa sehingga membentuk suatu unit struktural yang dinamakan lobulus hati (Leeson & Thomas, 1990; Lu, 2009). Tiap-tiap sel hati atau hepatosit dapat melakukan berbagai fungsi metabolik tubuh, kecuali aktivitas fagositik yang dilakukan oleh sel Kupffer. Setiap hepatosit berhubungan langsung dengan darah dari dua sumber, yaitu darah vena dari saluran pencernaan dan darah arteri dari aorta (Sherwood, 2001).

2.6.2 Histologi Hati

Dilihat dari segi histologi, struktur dan komponen selular hati mencit pada dasarnya sama seperti struktur pada mamalia lainnya. Hati terdiri atas beberapa komponen selular, seperti hepatosit (sel parenkim), sel-sel sinusoidal (sel endotel, sel *Kupffer*, *fat-storing* dan sel pit), sel hematopoietik, sel saraf, pembuluh darah

dan limfe. Lobus hati dibungkus oleh kapsula. Lobus hati terdiri atas kapsula fibrosa dan kapsula serosa. Kapsula dibungkus oleh peritoneum, namun ada beberapa area kapsula yang dapat berhubungan langsung dengan diafragma dan organ visera pada dinding abdomen posterior.

Hepatosit berbentuk polihedral, intinya bulat terletak di tengah, terdapat satu atau lebih nukleolus dengan kromatin yang menyebar. Sering pula terlihat adanya dua inti sebagai hasil pembelahan yang tidak sempurna dari sitoplasma Hepatosit tersusun atas lempeng-lempeng sel hati yang mengelilingi vena sentralis (Dellman & Brown, 1992).

Sinusoid merupakan pembuluh darah kapiler yang mengisi lobulus yang membawa darah dari arteri dan vena interlobular, kemudian menuju vena sentralis. Dinding sinusoid memiliki banyak celah karena dindingnya terdiri atas endotel dan sel-sel makrofag besar yang aktif, yang disebut dengan sel *Kupffer* yang berasal dari monosit. Darah meninggalkan lobulus melalui vena sentralis atau vena hepatica terminalis yang dilapisi oleh endotel dengan lamina basalis dan adventisia tipis, kemudian langsung berhubungan dengan sinusoid.

Vena sentralis berhubungan dengan vena sublobular atau vena interkalatus di tepi lobulus. Kedua vena tersebut terdapat di sepanjang basis lobulus, dimana sebagian bergabung membentuk vena penampung (*collecting vein*) yang nantinya bergabung menjadi vena hepatica (Dellman & Brown, 1992).

2.6.3 Intoksikasi Hati

Kerusakan yang terjadi pada hati biasanya disebabkan oleh racun. Ada dua hal yang menyebabkan hati terkena racun. Pertama, hati menerima kurang lebih 80% suplai darah dari vena porta yang mengalirkan darah dari sistem gastrointestinal, sehingga memungkinkan zat-zat toksik yang berasal dari tumbuhan, fungi, bakteri, logam, mineral, dan zat-zat kimia lain yang diserap ke darah portal ditransportasikan ke hati. Kedua, hati menghasilkan enzim-enzim yang mampu melakukan biotransformasi pada berbagai macam zat eksogen maupun endogen untuk dieliminasi oleh tubuh (Carlton & Mc Gavin, 1995).

Kegagalan fungsi hati kemungkinan baru terjadi setelah sebagian besar (70%) sel-sel parenkim hati atau hepatosit mengalami kerusakan. Dalam fungsi detoksifikasi, senyawa yang memiliki sifat meracuni sel-sel tubuh oleh hati akan diubah menjadi senyawa yang lebih polar dan larut air untuk kemudian oleh darah dibawa ke ginjal dan diekskresikan (Frank & Lu, 2009).

Mekanisme kerusakan dan kematian sel hati dapat disebabkan oleh proses apoptosis maupun nekrosis sel. Nekrosis dapat menyebabkan *swelling* dan hilangnya integritas membran sel. Biasanya nekrosis merupakan kerusakan akut. Beberapa zat kimia telah dibuktikan atau dilaporkan menyebabkan nekrosis pada hati (Zimmerman, 1982). Apoptosis sebenarnya merupakan kerusakan sel yang sudah terprogram dan dikhususkan untuk sel yang sudah tidak terpakai lagi. Pada keadaan tertentu, kadang-kadang menguntungkan. Jika terjadi kegagalan, seperti apoptosis yang terlalu dini maka akan menyebabkan kerusakan sel hati yang selanjutnya dapat menyebabkan kegagalan fungsi hati. Nekrosis dan apoptosis ini berbahaya bagi hati tetapi tidak selalu bermakna secara klinik karena hati mempunyai kapasitas pertumbuhan (regenerasi) yang cepat (Sherwood, 2001).

2.7 Ginjal

2.7.1 Anatomi dan Fisiologi Ginjal

Organ ginjal merupakan organ berwarna kemerahan yang berbentuk seperti kacang. Pada manusia terdapat pada daerah diatas pinggang di antara parietal peritoneum dan dinding posterior abdomen atau disebut sebagai retroperitoneal dengan panjang 10 cm sampai 12 cm, lebar mencapai 5 cm sampai 7,5 cm dan ketebalan 2,5 cm (Tortora & Nicholas, 1990). Ginjal menghasilkan urin yang turun melewati ureter ke kandung kemih untuk disimpan sementara dan akhirnya secara periodik dikeluarkan melalui uretra (Sherwood, 2001).

Struktur ginjal dengan potongan memanjang memberi gambaran dua daerah yang cukup jelas. Daerah perifer yang berwarna lebih gelap disebut korteks dan selebihnya yang agak cerah disebut medula, berbentuk piramida terbalik. Tiap bagian medula yang berbentuk piramida dengan jaringan korteks yang membentuk tudung pada dasar serta menutup sisinya membentuk lobus yang merupakan unit anatomi ginjal. Dalam ginjal terdapat kurang lebih satu juta

nefron, tiap nefron terdiri dari glomerulus dan serangkaian tubulus. Pada saat darah mengalir melalui glomerulus, terjadi filtrasi plasma bebas protein menembus kapiler glomerulus ke dalam kapsula Bowmann (Dellman, 1992).

Fungsi utama ginjal adalah untuk mengeksresikan air dan produk-produk sisa metabolisme tubuh (urea, asam urat, dan kreatinin). Glomerulus ginjal menyaring antara 10% sampai 30% dari plasma, ketika darah mengalir melalui arteri ginjal kemudian mengalir sampai tubula sebagai filtrat, maka hasil ikutan metabolisme yang tidak dikehendaki seperti urea dan kreatinin tetap tertahan dalam tubula. Ginjal juga mengatur keseimbangan komposisi cairan tubuh dan elektrolit serta asam basa dengan reabsorpsi selektif air, elektrolit dan non elektrolit (Sherwood, 2001; Bevelander & Ramaley, 1988).

2.7.2 Histologi Ginjal

Ginjal dibagi menjadi dua daerah utama, yaitu korteks di bagian luar dan medula di bagian dalam (Guyton & Hall, 1997). Secara normal korteks berwarna merah gelap hingga coklat. Medula berwarna abu-abu pucat dan memiliki papila. Ginjal manusia terdiri atas enam papila. Mencit hanya memiliki satu papila. Kapiler glomerulus dilapisi oleh sel-sel epitel, dan seluruh glomerulus dibungkus oleh kapsula Bowmann. Cairan yang difiltrasi dari kapiler glomerulus mengalir ke dalam kapsula Bowmann dan kemudian masuk ke tubulus proksimal, yang terletak pada korteks ginjal (Guyton & Hall, 1997).

Cairan dari tubulus proksimal mengalir ke ansa Henle yang masuk ke dalam medula renal. Setiap lengkung terdiri atas cabang desenden dan asenden. Di tengah perjalanan kembali cabang asenden dari lengkung tersebut menuju korteks, dindingnya menjadi tebal seperti bagian lain dari sistem tubular. Ujung cabang asenden yang pendek yang tebal merupakan bagian yang pendek, dan dikenal sebagai makula densa. Setelah makula densa, cairan memasuki tubulus distal yang terletak pada korteks renal, seperti tubulus proksimal. Setelah melalui tubulus distal kemudian dilanjutkan dengan tubulus rektus dan tubulus kolangentes kortikal, yang menuju ke duktus kolangentes kortikal. Duktus kolangentes bergabung membentuk duktus yang lebih besar secara progresif yang

akhirnya mengalir menuju pelvis renal melalui ujung papila renal. Pada akhirnya urin yang terbentuk akan diekskresikan melalui ureter (Guyton & Hall, 1997).

2.7.3 Intoksikasi Ginjal

Ginjal adalah organ utama yang memiliki toksisitas spesifik karena keunikannya dalam filtrasi, metabolisme, dan mengeksresi senyawa xenobiotik. Ginjal juga memiliki kemampuan untuk memisahkan ikatan protein dengan racun. Beberapa zat kimia bersifat toksik terhadap ginjal apabila telah masuk ke dalam sel epitel tubulus ginjal. Senyawa-senyawa tersebut diekskresi bersama urin melalui ginjal (Seely, 1999).

Peranan ginjal dalam homeostasis tubuh sangat vital sehingga setiap gangguan fungsinya segera dicerminkan dalam gangguan cairan tubuh, bahkan bisa disertai kematian apabila gangguan tersebut sudah sangat parah (Spector & Spector, 1993). Tubulus proksimal merupakan bagian yang paling mudah mengalami luka akibat iskemia dan zat toksik. Hal ini dikarenakan pada tubulus proksimal terjadi proses absorpsi dan sekresi, sehingga kadar zat toksik lebih tinggi (Lu, 2009).

Proses kematian sel epitel tubulus ginjal juga dapat terjadi melalui dua proses, yaitu nekrosis dan apoptosis. Nekrosis dapat diketahui dengan jelas karena adanya eosinofil sitoplasma yang kuat dan perubahan bentuk inti sel menjadi piknosis atau karyoreksis. Adapun apoptosis pada sel epitel tubulus ginjal mengalami kematian yang bersifat fisiologis (perkembangan normal) dan patologis (akibat agen penginfeksi atau toksikan) serta melibatkan sel secara individu tanpa menghasilkan produk sel (sitokin) pra peradangan (Cheville, 2006).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Toksikologi Pusat Sarana Pengendalian Dampak Lingkungan (PUSARPEDAL) atau “*Environment Management Center*”, Kementerian Lingkungan Hidup, Komplek Puspiptek Gedung 210, Serpong, Banten dan Laboratorium Patologi Balai Besar Pengembangan Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH), Gunung Sindur, Bogor dari bulan Februari hingga Mei 2012.

3.2 Bahan

3.2.1 Hewan Uji

Pada penelitian ini, hewan uji yang digunakan adalah mencit betina galur DDY berumur 6 minggu dengan berat badan 20 – 30 gram sebanyak 120 ekor. Hewan uji diperoleh dari bagian Non Ruminansia dan Satwa Harapan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih betina galur DDY yang berumur 6 minggu dengan berat badan 20 – 30 gram sebanyak 120 ekor. Pemilihan hewan uji dilakukan secara acak satu hari sebelum perlakuan dimulai, guna menjamin homogenitas kelompok dalam berat badan.

Mencit dipilih sebagai hewan uji karena mencit mudah untuk dibiakkan, tersedia data toksikologis, harganya relatif murah, memiliki variasi inter spesies yang lebih sedikit, dan secara teknis mudah ditangani (Gad & Changelis, 1990; Inggris, 1980; Lu, 2009; Barile, 2008). Pada penelitian ini, mencit jantan tidak diikutsertakan karena menurut beberapa penelitian menyatakan bahwa hewan uji betina (tikus maupun mencit) lebih sensitif dalam pengujian (OECD, 2001a,b,c).

3.2.2 Bahan Uji

Pada penelitian, bahan uji yang digunakan adalah serbuk standar tembaga (II) sulfat pentahidrat (Wako Chemicals),

3.2.3 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan berupa larutan natrium klorida (NaCl) 0,9 % (Merck), larutan formalin (Merck), alkohol absolut (Merck), alkohol teknis 70%, alkohol teknis 90%, alkohol teknis 95%, benzil benzoat (teknis), benzol (Merck), parafin (Merck), albumin Mayer (Merck), xilol (Merck), asam klorida (HCl) 1%, Hematoksilin Bohmer (Merck), Eosin (Merck), entelan (Merck), air suling dan akuades.

Tabel 3.1 Komposisi larutan yang digunakan dalam pembuatan sediaan histologi

No	Nama Larutan	Komposisi Zat	Jumlah zat
1.	Larutan NaCl 0,9 %	NaCl	9 g
		Akuades	1000 ml
2.	Larutan Formalin 10%	Formalin 40%	125 ml
		Akuades	ad 500 ml
3.	Albumin Mayer	Putih telur	10 ml
		Gliserin	10 ml
4.	Larutan Hematoksilin Bohmer	Kristal Hematoksilin*	5 g
		Potasium alum**	100 g
		Alkohol 70%	60 ml
		Akuades	1000 ml
5.	Larutan Eosin Y	Eosin Y	1 g
		Akuades	100 ml

[Sumber: Luna, 1968; Clark, Coalson & Nordquist, 1973]

Keterangan:

* Kristal Hematoksilin dilarutkan dalam alkohol

** Potasium Alum dilarutkan dalam akuades

3.3 Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

3.3.1 Alat

Pada penelitian ini digunakan *slide warmer* (Sakura), *rotary processor* (Sakura), mikrotom geser (Yamato Kohki), *ultra histo dyer* (Sakura), *paraffin hot vat* (Sakura), mikroskop Nikon Eclipse 80i, timbangan (KERN pcb), sonde

lambung, spuit 1 ml (Terumo), *plate*, cawan, gunting dan pisau bedah, pipet, kaca objek dan kaca penutup, gelas Erlenmeyer, pipet volumetrik, gelas ukur 10 ml, 25 ml dan 50 ml, labu takar 50,0 ml dan 100,0 ml, botol semprot, pinset, timer, rak kandang, kandang hewan uji, botol minum, sarung tangan, dan wadah pakan.

3.3.2 Perangkat Lunak

Perangkat Lunak berupa AOT425StatPgm (Westat, U.S Environmental Protection Agency) dan NIS Elements D 4.00.00 (Nikon).

3.4 Cara kerja

3.4.1 Persiapan Hewan Uji

Mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama 1 minggu (minimal 5 hari) dengan tujuan mengadaptasikan mencit dengan lingkungan yang baru serta meminimalisir efek stres pada mencit yang dapat mempengaruhi penelitian. Pada tahap ini dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum hewan uji (OECD, 2001a,b,c; Barile, 2008).

Mencit yang diikutsertakan dalam percobaan adalah mencit yang sehat dengan ciri-ciri mata merah jernih, bulu tidak berdiri, bertingkah laku normal, mengalami peningkatan berat badan dalam batas tertentu yang diukur secara rutin. Mencit ditimbang beratnya secara berkala untuk mengontrol berat badan. Untuk membedakan masing-masing mencit perlakuan, dilakukan penandaan mencit menggunakan spidol permanen. Mencit diberi makan dengan takaran pakan 5 gram/ekor/hari serta diberi minum secukupnya (*ad libitum*).

Kondisi ruangan tempat dilangsungkannya percobaan juga dijaga setiap hari. Suhu ruangan diatur pada kisaran 27 ± 2 °C, kelembaban ruangan berada pada kisaran 50-70 %, serta pencahayaan diatur pada 12 jam terang dan 12 jam gelap mengikuti aturan OECD (Lampiran 12) (OECD, 2001a,b,c).

3.4.2 Penetapan Dosis *Reference Toxicant* Tembaga (II) Sulfat

Dosis yang digunakan mengikuti panduan OECD 425. Dosis awal yang diberikan adalah setengah dosis lebih rendah dari LD₅₀ yang tertera pada *Material Safety Data Sheet*. Dalam *Material Safety Data Sheet* yang dikeluarkan oleh Wako Chemicals, diketahui LD₅₀ akut oral tembaga (II) sulfat adalah 960 mg/kg

Universitas Indonesia

pada tikus dan 2150 mg/kg bb setelah dikonversikan ke dosis mencit. Faktor pengalihan antar dosis yang ditetapkan oleh OECD 425 adalah 3,2. Sehingga jika nilai LD₅₀ sudah diketahui, maka untuk menghitung dosis pertama dan dosis kedua, cukup mengalikan dan membagi dengan 1,6 (faktor pengalihan 3,2 dibagi 2 = 1,6). Dosis awal yang diberikan adalah 840 mg/kg bb (Lampiran 4). Dosis yang diberikan selanjutnya tergantung hasil dari dosis pertama. Jika hewan uji mati, maka dosis pada hewan uji selanjutnya diturunkan. Sebaliknya, jika hewan uji hidup, maka dosis pada hewan uji selanjutnya dinaikkan.

3.4.3 Persiapan Bahan

3.4.3.1 Larutan Tembaga (II) Sulfat

Tembaga (II) Sulfat dilarutkan dalam larutan akuades sesuai dengan perhitungan dosis.

3.4.4 Pelaksanaan Penelitian

Pada percobaan ini dilihat apakah terjadi efek toksik yang ditimbulkan akibat pemberian larutan *reference toxicant*. Efek toksik yang ditimbulkan dapat berupa kematian atau perubahan perilaku hewan uji. Pemberian larutan uji dilakukan dengan dosis tunggal secara oral menggunakan sonde lambung. Nilai LD₅₀ ditentukan dengan menghitung jumlah mencit yang mati dan hidup tiap pengujian pada maksimal 48 jam setelah perlakuan. Tahapan dari pengujian toksisitas akut oral OECD 425 adalah:

1. Sebelum perlakuan mencit dipuasakan dahulu 4 jam sebelumnya.
2. Ketika perlakuan, mencit kontrol hanya diberi akuades sebanyak volume larutan yang diberikan pada mencit yang diberi perlakuan dosis *reference toxicant*.
3. Mencit diberi dosis secara bertahap dalam selang waktu 48 jam. Perlakuan pada mencit selanjutnya menunggu setelah mencit sebelumnya dipastikan hidup/mati.
4. Pada pengujian pertama, mencit pertama diberi dosis awal 840 mg/kg bb tembaga (II) sulfat. Jika hewan pertama hidup, maka hewan kedua diberikan pada dosis yang lebih tinggi. Jika mencit pertama mati atau sekarat, mencit

yang kedua diberikan pada dosis yang lebih rendah. Pemberian dosis dengan cara ini dilakukan berulang-ulang hingga memenuhi kriteria yang ditentukan oleh OECD.

5. Pengujian dihentikan bila memenuhi kriteria (Lampiran 1):

Tiga hewan hidup pada batas atas pengujian (5000 mg/kg); Lima pengulangan muncul pada 6 hewan yang diujikan. Dimulai dari dosis terendah saat ditemukan hewan uji yang hidup, setelah itu dilakukan uji pada konsentrasi diatas dosis terendah tersebut dan uji pada kedua konsentrasi ini dilakukan sebanyak 2x (*vice versa*) dan penghentian dihentikan jika ditemukan 3x kematian pada 4 konsentrasi yang sama.

6. Pengujian dilakukan triplo.

3.4.5 Pengamatan Hewan Uji

Pengamatan hewan uji dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian *reference toxicant* terhadap aktivitas dan gejala toksisitas mencit. Pengamatan pertama dilakukan secara individual sedikitnya 30 menit hingga 3 jam setelah pemberian. Kemudian pengamatan dilakukan berulang pada 24 jam kemudian sampai 7 hari kecuali jika hewannya mati maka pengamatan dihentikan. Berdasarkan OECD 425, waktu pengamatan adalah 14 hari, maka dilakukan pula uji toksisitas akut metode OECD 425 dengan waktu pengamatan 14 hari sebagai data pembanding. Pengamatan gejala klinis berdasarkan kriteria yang ditentukan oleh OECD 425 (2001a) (Lampiran 5), yang nantinya akan menjadi data kualitatif. Mencit tampak sehat adalah berdasar pengamatan luar, meliputi gerak aktif dan nafsu makan normal. Data dan pelaporan hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel meliputi jumlah hewan, berat badan, saat kematian, parameter gejala toksisitas yang terjadi.

3.4.6 Perhitungan Nilai LD₅₀

Nilai LD₅₀ ditentukan secara statistik mengikuti prinsip *maximum likelihood method*. Seluruh dosis dan respon hewan uji dimasukkan ke dalam *software* AOT425StatPgm untuk menentukan estimasi nilai LD₅₀.

3.4.7 Pembuatan *Control Chart*

Dalam pembuatan *control chart*, diperlukan minimal 5 kali pengujian toksisitas akut oral untuk melihat presisi dari nilai LD₅₀. Seluruh data pengujian toksisitas akut oral kemudian diolah kedalam bentuk grafik *control chart*.

3.4.8 Pembuatan Sediaan Histologi Dengan Metode Parafin (Tanzil, 1996; Junquiera, 1997)

3.4.8.1 Pengambilan Organ

Pembedahan mencit dilakukan 7 hari setelah pemberian larutan uji atau setelah mencit mengalami kematian. Sebelum pembedahan mencit dibius terlebih dahulu dengan eter, lalu diletakkan telentang pada papan bedah. Keempat kakinya diikat, bagian dada dan perut dibasahi dengan alkohol 70% lalu dada dibuka. Organ hati dan ginjal yang telah diambil kemudian dibersihkan dari lemak yang membungkusnya dan dicuci dengan larutan natrium klorida 0,9%.

3.4.8.2 Penyiapan Preparat Organ

Setelah organ hati dan ginjal dibersihkan dan dicuci dengan larutan natrium klorida 0,9%, kemudian organ hati dan ginjal dipotong dengan ketebalan $\pm 0,5$ cm dan dimasukkan ke dalam *tissue cassette*. Tahapan selanjutnya dilakukan pembuatan preparat histologis.

Tahap pembuatan sediaan tersebut diantaranya adalah:

a. Fiksasi

Organ hati dan ginjal yang sudah dimasukkan ke dalam *tissue cassette* kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi larutan formalin 10% selama 24 jam.

b. Dehidrasi

Organ hati dan ginjal direndam dalam alkohol seri konsentrasi naik, diantaranya alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, lalu alkohol 90% selama 1 jam, dan alkohol absolut selama 1 jam sebanyak 2 kali.

c. Penjernihan

Organ hati dan ginjal direndam dalam larutan benzil benzoat selama 24 jam hingga organ terlihat transparan, kemudian organ hati dimasukkan dalam larutan benzol selama 15 menit sebanyak 2 kali ulangan.

d. Infiltrasi

Parafin dicairkan terlebih dahulu dalam oven (titik leleh 58-72°C). Kemudian organ hati direndam dalam parafin tersebut selama 1 jam sebanyak 2 kali ulangan. Proses infiltrasi dilakukan pada suhu tetap 72°C. Proses fiksasi, dehidrasi, penjernihan, dan infiltrasi menggunakan alat *Rotary Processor* yang sudah disetel otomatis.

e. Penanaman (*Embedding*)

Potongan-potongan organ hati dan ginjal yang ada di dalam *tissue cassette* dimasukkan ke dalam alat logam berbentuk kotak berisi parafin yang telah dicairkan, kemudian dibiarkan hingga parafin dingin dan mengeras. Apabila terdapat gelembung udara di dalam parafin, dapat dihilangkan dengan cara menyentuhkan sonde panas pada gelembung tertentu. Proses penanaman (*embedding*) menggunakan alat *Paraffin Hot Vat*. Peletakan organ pada parafin harus sesuai dengan bidang pemotongan yang diinginkan. Hasil cetakan blok tersebut disimpan dalam *refrigerator* (4-6° C).

f. Penyayatan (*Sectioning*)

Parafin yang berisi organ hati dikeluarkan dari *tissue cassette*, kemudian organ disayat menggunakan mikrotom. Parafin tersebut diletakkan pada besi pemegang, kemudian dipasang pada mikrotom. Penyayatan dilakukan dengan ketebalan 3µm.

g. Penempelan pada Gelas Obyek (*Mounting*)

Setelah dipotong, jaringan tersebut diletakkan diatas air hangat agar jaringan tidak mengkerut, kemudian hasil sayatan organ ditempel pada gelas objek yang sudah diusap dengan albumin Meyer (campuran putih telur dan

gliserin dengan perbandingan 1:1) dan ditetesi akuades, kemudian sayatan dipanaskan di atas *paraffin stretcher* pada suhu 46°C hingga jaringan mengembang dan dibiarkan hingga kering (selama 24 jam).

h. Deparafinasi

Tujuan deparafinasi adalah untuk menghilangkan parafin yang melekat pada sayatan dan sekitarnya pada gelas obyek. Cara yang dilakukan adalah dengan merendam gelas obyek dalam larutan xilol selama 5 menit sebanyak 2 kali ulangan.

i. Hidrasi

Proses hidrasi dilakukan dengan menggunakan larutan alkohol seri konsentrasi menurun. Materi sayatan pada gelas obyek yang sudah dibersihkan, direndam dalam larutan alkohol seri konsentrasi turun berturut-turut alkohol absolut, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 3 menit.

j. Pewarnaan (*staining*)

Pewarnaan dilakukan di dalam *staining jar*, dengan cara merendam sediaan tersebut dalam larutan pewarna Hematoksilin Bohmer 1% selama 4 menit, kemudian dicuci dengan akuades atau air mengalir. Apabila warna terlihat terlalu pekat, dilakukan pelunturan dengan cara mencelupkan sediaan ke dalam larutan asam klorida (HCl) 1% dengan 1 kali celup, selanjutnya sediaan diwarnai dengan Eosin Y 1% selama 4 menit.

k. Dehidrasi

Dalam hal ini, sediaan dicelupkan ke dalam alkohol seri konsentrasi naik, pada alkohol 70% ,80%, 90%, dan absolut selama masing-masing selama 3 menit.

l. Penjernihan

Sediaan direndam ke dalam larutan xilol sebanyak 2 kali, masing-masing selama 3 menit. Proses deparafinasi, hidrasi, pewarnaan, dehidrasi, dan penjernihan menggunakan alat *Ultra Histo Dyer* yang sudah disetel otomatis.

m. Penutupan

Xilol dan kotoran yang tersisa di sekitar jaringan pada sediaan dibersihkan dengan kertas tisu, kemudian ditetesi satu atau dua tetes entelan tepat di atas sayatan dan ditutup dengan kaca penutup. Apabila terdapat gelembung udara pada kaca penutup tekan-tekan sedikit agar gelembung hilang, selanjutnya sediaan tersebut dibiarkan mengering pada suhu kamar.

3.4.9 Pengamatan Makroskopik Organ Hati dan Ginjal

Pada penelitian ini, pengamatan makroskopik dilakukan pada organ-organ vital yaitu organ hati dan ginjal. Pengamatan dilakukan dengan cara membandingkan berat basah organ hati dan ginjal terhadap bobot tubuh mencit kontrol dengan mencit yang diberi perlakuan.

3.4.10 Pengamatan Mikroskopik Organ Hati dan Ginjal

Pengamatan dilakukan terhadap sampel dengan menggunakan mikroprojektor yang dipasang pada lensa okuler mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Pengamatan organ dilakukan dengan cara membandingkan preparat histologi mencit kontrol dengan mencit perlakuan menggunakan mikroskop cahaya.

Penilaian derajat kerusakan lobulus hati dilakukan dengan mengukur diameter vena sentralis dan mencatat kerusakan-kerusakan yang terjadi. Derajat kerusakan dibedakan dalam tiga tingkatan yaitu degenerasi <20% (nekrosis ringan), degenerasi 20%-40% (nekrosis sedang) dan degenerasi lebih dari 40% (nekrosis berat). Untuk mengetahui besarnya kerusakan yang terjadi pada ginjal maka dilakukan pengukuran diameter glomerulus dan jarak ruang antara glomerulus dan kapsula Bowmann.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengujian Nilai LD₅₀ Menggunakan Metode OECD 425

Pada pengujian pertama, mencit yang diberikan dosis 840 mg/kg bb tidak ditemukan kematian baik pada pengamatan jangka pendek (48 jam) maupun jangka panjang (7 hari). Setelah 48 jam, maka dilakukan peningkatan dosis yaitu 2150 mg/kg bb pada mencit yang berbeda. Pada pemberian dosis 2150 mg/kg bb, dalam waktu kurang dari 48 jam keseluruhan mencit yang diberi perlakuan mengalami kematian. Pemberian dosis pada mencit berikutnya kembali pada dosis awal yaitu 840 mg/kg bb. Hasil pada dosis ini, kembali tidak ditemukan kematian baik pada pengamatan jangka pendek (48 jam) maupun jangka panjang (7 hari). Mencit berikutnya diberikan dosis yang lebih tinggi yaitu 2150 mg/kg bb, dalam waktu 4 jam (kurang dari 48 jam) keseluruhan mencit yang diberi perlakuan dosis mengalami kematian. Pemberian dosis seperti ini dilakukan sebanyak 3x dosis 840 mg/kg bb (dosis yang tidak menyebabkan kematian) dan 3x dosis 2150 mg/kg bb (dosis yang menyebabkan kematian) menurut hasil dari uji pendahuluan.

Data dari hasil uji toksisitas akut metode OECD 425 kemudian dimasukkan ke dalam *software* AOT425StatPgm yang dikeluarkan oleh *US Environmental Protection Agency* (USEPA, 2002a). Estimasi nilai LD₅₀ tembaga (II) sulfat pentahidrat pada mencit yang didapat dari *software* tersebut adalah 1344 mg/kg bb (Tabel 4.1 dan 4.12; Lampiran 6, 7, 8, 9, 10 dan 11) dengan tingkat kepercayaan 95%. Setelah dikonversikan ke dosis tikus, diperoleh hasil LD₅₀ yang sama dengan literatur yaitu 960 mg/kg bb pada tikus. Hal ini membuktikan bahwa uji toksisitas akut metode OECD 425 ini memiliki akurasi yang baik.

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Biasanya dinyatakan sebagai persen perolehan kembali atau *recovery* (Hadi, 2007). Namun, dalam pengujian menggunakan hewan uji, tidak dimungkinkan untuk melakukan uji perolehan kembali (UPK) sehingga cukup membandingkan hasil uji dengan nilai LD₅₀ hasil konversi ke dosis mencit yaitu 1344 mg/kg bb.

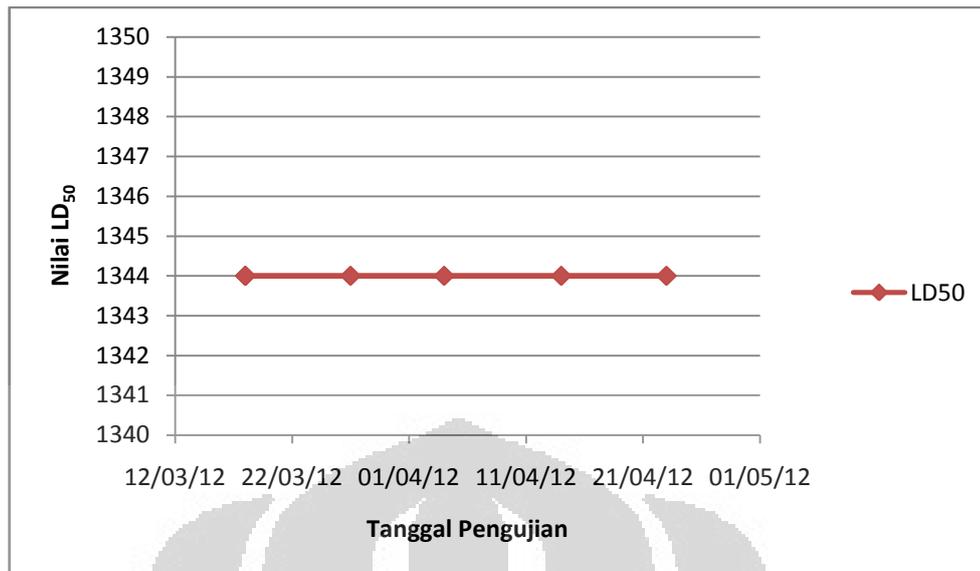
Pengamatan jangka panjang dalam OECD 425 adalah 14 hari. Oleh karena itu, dilakukan pula uji toksisitas akut oral OECD 425 dengan pengamatan 14 hari sebagai data pembanding untuk melihat ada tidaknya perbedaan hasil nilai LD₅₀ yang dihasilkan. Hasil nilai LD₅₀ pada pengamatan 7 hari dan 14 hari sama-sama bernilai 1344 mg/kg bb.

Tabel 4.1 Data hasil pengujian nilai LD₅₀

Mencit	Dosis	Hasil Jangka pendek (2 hari)		Hasil Jangka Panjang (7 hari)
1	840	O		O
2	2150	X		X
3	840	O		O
4	2150	X		X
5	840	O		O
6	2150	X		X
Estimasi LD₅₀ = 1344 mg/kg bb				
Dosis	O	X	Total Hewan Uji	
840	3	-	3	
2150	-	3	3	
Seluruh dosis	3	3	6	
Estimasi LD₅₀ = 1344 mg/kg bb				
Keterangan : O = hidup X = mati				

4.2 Pembuatan *Control Chart* Uji Toksisitas Akut Metode OECD 425

Hasil pengujian dengan *reference toxicant* selama 5 kali pengulangan pada waktu yang berbeda diplot ke dalam grafik yang disebut *control chart* yang memplot LD₅₀ dari *batch* yang berbeda dalam 1 spesies hewan uji dengan 1 *reference toxicant* dari waktu ke waktu dan dibandingkan dengan batas dari *control chart*. Batas dari *control chart* menggunakan mean ± dua standar deviasi, dan minimum 5 data untuk membuat sebuah *control chart*. Dua standar deviasi dibawah mean adalah *lower control limit* (LCL), dan dua standar deviasi diatas mean adalah *upper control limit* (UCL). Respon hewan uji yang baik harus berada dalam jarak antara LCL dan UCL (USEPA, 2002c; Gad & Changelis, 1990).



Gambar 4.3 Diagram *Control Chart* LD₅₀ Hasil Pengujian Toksisitas Akut Metode OECD 425

Hasil grafik *control chart* berbentuk lurus dikarenakan nilai LD₅₀ pada ulangan pertama sampai kelima menunjukkan hasil yang sama yaitu 1344 mg/kg bb (Gambar 4.3) sehingga standar deviasi yang didapatkan adalah nol dengan nilai mean = 1344 mg/kg bb. Pada penentuan nilai LD₅₀ menggunakan metode OECD 425, jarak antar dosis adalah 3,2 dan angka yang dimasukkan ke dalam *software* adalah angka yang telah mengalami pembulatan sehingga hasil LD₅₀ dari kelima pengujian menghasilkan nilai yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa pengujian toksisitas akut oral OECD 425 menunjukkan presisi yang baik (Lampiran 6, 7, 8, 9, dan 10; Tabel 4.10). Presisi atau keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi).

4.3 Pengamatan Perilaku Mencit selama Uji Toksisitas Akut

Hasil pengamatan gejala klinis berdasarkan kriteria yang ditentukan oleh OECD 425 (2001a) (Lampiran 5) akan menjadi data kualitatif dalam penelitian ini. Pada mencit yang hanya diberi akuades (kontrol normal) tidak menimbulkan gejala toksisitas. Mencit tampak sehat dengan gerak aktif, dan nafsu makan normal. Mencit yang diberi perlakuan dosis 840 mg/kg bb dan 2150 mg/kg bb memperlihatkan gejala toksisitas yang cukup jelas untuk diamati (Tabel 4.2).

Pengamatan jangka panjang dalam OECD 425 adalah 14 hari. Oleh karena itu, dilakukan pula uji toksisitas akut oral OECD 425 dengan pengamatan 14 hari sebagai data pembanding untuk melihat ada tidaknya perbedaan gejala toksisitas yang dihasilkan.

Pada mencit yang diberi perlakuan dosis 840 mg/kg bb, gejala toksisitas yang terjadi adalah kehilangan nafsu makan setelah pajanan *reference toxicant* yang berlangsung selama hari pertama hingga hari keempat pengujian, aktivitas motorik juga mengalami penurunan, diare, serta pada 4 jam awal setelah pajanan *reference toxicant* terlihat pernapasan yang tidak teratur pada mencit, serta nafsu makan yang menurun, baik pada pengamatan 7 hari maupun pengamatan 14 hari.

Pada mencit yang diberi perlakuan dosis 2150 mg/kg bb, terlihat gejala toksisitas seperti pernafasan tidak teratur, aktivitas motorik menurun, tersedak kemudian muntah dan diare. Gejala toksisitas lain yang terlihat adalah berkeliling tanpa arah (setelah 2 jam pajanan larutan *reference toxicant*), konvulsi, setelah itu diikuti dengan kematian pada jam keempat, baik pada pengamatan 7 hari maupun pengamatan 14 hari.

Tabel 4.2 Gejala toksik yang muncul setelah pajanan larutan *reference toxicant* tembaga (II) sulfat pentahidrat

Mencit	Gejala Toksisitas
Kontrol normal	-
Dosis I	Kehilangan nafsu makan, aktivitas motorik turun muntah, pernafasan tidak teratur, diare.
Dosis II	Aktivitas motorik turun, muntah, pernafasan tidak teratur, berkeliling tanpa arah, gelisah, diare, konvulsi, diikuti kematian

Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

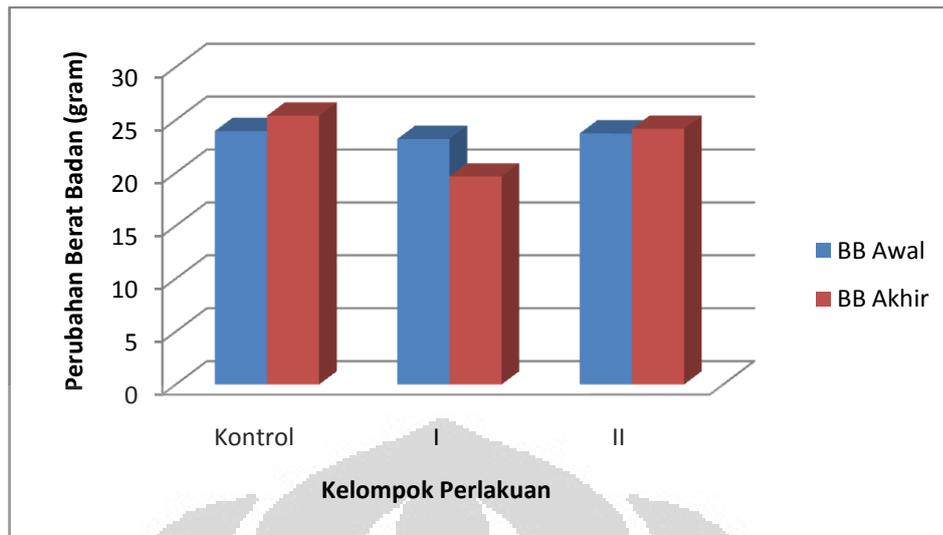
Hal ini disebabkan karena iritasi lokal dan aksi ion tembaga pada lambung dan usus. Muntah biasanya setelah 5 menit sampai dengan 10 menit (dalam keadaan lambung kosong), tetapi bila lambung sedang penuh dengan makanan, maka muntah akan terjadi antara 0,5 jam sampai satu jam lebih (Adiwisastro, 1985; Dreisbach, 1982). Gejala klinis keracunan tembaga sangat bergantung pada

jumlah yang masuk ke dalam tubuh. Untuk dosis yang kecil antara 15 mg dan 1 gram (untuk manusia), gejala yang menonjol adalah pada gastrointestinal. Jika tembaga yang masuk ke dalam tubuh melebihi 1 gram, maka akibat fatal keracunan tembaga akan terjadi. Gejala toksisitas yang terjadi adalah rasa logam yang terasa pada mulut, rasa panas dalam perut, muntah, dan diare, perdarahan pada gastrintestinal, haemolisis dan *jaundice* (Gunay., et al, 2006; Franchitto., et al, 2008).

4.4 Pengamatan Terhadap Berat Badan Mencit selama Uji Toksisitas Akut

Selama pelaksanaan uji toksisitas akut oral OECD 425 “*Up-and-Down Procedure*”, perubahan berat badan mencit selalu diamati (OECD, 2001a,b,c). Pengamatan jangka panjang dalam OECD 425 adalah 14 hari. Oleh karena itu, dilakukan pula uji toksisitas akut oral OECD 425 dengan pengamatan 14 hari sebagai data pembandingan untuk melihat ada tidaknya perbedaan berat badan setelah uji toksisitas akut.

Larutan *reference toxicant* yang diberikan kepada mencit memperlihatkan perubahan berat badan, baik pada mencit dengan perlakuan dosis 840 mg/ kg bb maupun mencit dengan perlakuan dosis 2150 mg/kg bb. Berat badan rata-rata mencit kelompok kontrol normal mengalami peningkatan. Mencit dengan perlakuan dosis 840 mg/kg bb memperlihatkan penurunan berat badan yang cukup signifikan baik pada pengamatan 7 hari maupun pengamatan 14 hari, sedangkan mencit dengan perlakuan dosis 2150 mg/kg bb mengalami sedikit kenaikan berat badan baik pada pengamatan 7 hari maupun pengamatan 14 hari. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.4 dan Tabel 4.8 dan 4.10.



Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Gambar 4.4. Perubahan Berat Badan Mencit Tiap Kelompok Perlakuan

Penurunan berat badan pada mencit dengan perlakuan dosis 840 mg/kg bb ini dikarenakan efek toksik dari logam Cu yang masuk ke dalam tubuh mencit mengakibatkan gangguan pada gastrointestinal sehingga menyebabkan rasa sakit untuk menelan makanan dan diikuti dengan hilangnya nafsu makan sehingga berat badan mencit pun menurun (Franchitto., *et al*, 2008). Sedangkan pada mencit yang diberi perlakuan dosis 2150 mg/kg bb, yaitu dosis yang menyebabkan kematian pada mencit dalam waktu 4 jam mengalami sedikit kenaikan kemungkinan karena volume larutan tembaga (II) sulfat pentahidrat yang masuk ke dalam tubuh mencit.

4.5 Pengamatan Makroskopik Organ

Pengamatan makroskopik pada organ diperlukan untuk melihat adanya pengaruh pemberian *reference roxicant* tembaga (II) sulfat pentahidrat terhadap bobot organ dan kelainan yang terjadi. Organ yang diamati dalam penelitian ini adalah organ hati dan ginjal. Pengamatan jangka panjang dalam OECD 425 adalah 14 hari. Oleh karena itu, dilakukan pula uji toksisitas akut oral OECD 425 dengan pengamatan 14 hari sebagai data pembanding untuk melihat ada tidaknya perbedaan makroskopik organ setelah uji toksisitas akut. Dari hasil pengamatan

Universitas Indonesia

makroskopik organ hati dan ginjal mencit terlihat beberapa organ mengalami kelainan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kelainan tersebut terjadi pada kelompok mencit yang diberi perlakuan dosis 840 mg/kg bb dan 2150 mg/kg bb.

4.6.1 Pengamatan Makroskopik Organ Hati

Hati merupakan organ tubuh terbesar dan organ metabolisme yang paling kompleks di dalam tubuh. Organ tubuh ini terlibat dalam metabolisme zat makanan serta sebagian besar obat dan toksikan (Lu, 2009). Oleh sebab itu, hati menjadi organ yang sangat potensial menderita keracunan terlebih dahulu sebelum organ lain (Robbin & Kumar, 1995).

Pengamatan makroskopik organ hati setelah dilakukan pembedahan menunjukkan hasil yang berbeda pada tiap kelompok perlakuan. Berdasarkan hasil pengamatan secara kualitatif organ hati mencit kelompok kontrol normal berwarna merah segar (PANTONE 181 PC) menandakan hati normal, baik pada pengamatan 7 hari maupun 14 hari. Warna hati mencit kelompok dosis 840 mg/kg bb berwarna merah kecoklatan dan terlihat lebih gelap dibanding mencit kontrol normal (PANTONE 1815 PC), baik pada pengamatan 7 hari maupun 14 hari, sedangkan warna hati mencit kelompok dosis 2150 mg/kg bb berwarna merah coklat gelap (PANTONE 4695 PC), baik pada pengamatan 7 hari maupun 14 hari (Gambar 4.5 dan 4.6).

Perbedaan warna organ hati tersebut kemungkinan disebabkan oleh kongesti pada organ hati tersebut. Kongesti adalah peningkatan cairan pada suatu tempat yang terjadi karena proses pasif yang disebabkan kegagalan aliran cairan keluar dari jaringan, misalnya pada kerusakan vena. Jika dilihat secara visual maka daerah jaringan atau organ yang mengalami kongesti akan berwarna lebih merah (ungu) dan secara mikroskopik kapiler-kapiler dalam jaringan melebar penuh berisi darah. Terdapat dua mekanisme timbulnya kongesti, yaitu kenaikan jumlah darah yang mengalir ke daerah tersebut dan penurunan jumlah darah yang mengalir dari daerah tersebut. Kongesti dapat terjadi pada daerah yang mengalami peradangan (Greaves, 2000). Hasil makroskopik organ hati mencit kontrol normal dan perlakuan disajikan pada Gambar 4.5, 4.6, dan 4.7 dan Tabel 4.3, 4.8 dan 4.10.

Tabel 4.3 Data persen berat basah hati terhadap bobot tubuh mencit tiap perlakuan

Kelompok Perlakuan	Persen Berat Basah Hati terhadap bobot tubuh \pm SD (%)
Kontrol normal	5,75 \pm 0,20
Dosis I	7,22 \pm 0,12
Dosis II	6,07 \pm 0,10

Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Dari Tabel 4.3 terlihat bahwa persen berat basah hati terhadap bobot tubuh mencit antar kelompok perlakuan memiliki perbedaan. Pada mencit yang diberi perlakuan dosis, persen berat basah hati terhadap bobot tubuh mengalami peningkatan akibat kenaikan jumlah darah yang mengalir ke daerah tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa *reference toxicant* menimbulkan kerusakan pada hati mencit dilihat dari peningkatan berat basah hati terhadap bobot tubuh mencit dan kongesti yang dapat dilihat secara makroskopik.

4.6.2 Pengamatan Makroskopik Organ Ginjal

Ginjal adalah salah satu organ vital yang merupakan jalur utama ekskresi sebagian besar toksikan. Ginjal menerima kurang lebih 25% darah dari jantung, hal ini mengakibatkan ginjal mempunyai volume aliran darah yang tinggi, menyaring dan mengkonsentrasi toksikan pada filtrat oleh glomerulus, membawa toksikan melalui sel tubulus dan dapat mengaktifkan toksikan tertentu (Baron, 1993; Lu, 2009). Berdasarkan hal tersebut maka perubahan-perubahan yang terjadi pada fungsi organ ginjal diamati pada penelitian ini sebagai data pendukung dalam pengujian toksisitas akut.

Setelah dilakukan pembedahan, makroskopik organ ginjal juga menunjukkan hasil yang berbeda pada tiap perlakuan. Berdasarkan hasil pengamatan secara kualitatif organ ginjal mencit kelompok kontrol normal berwarna merah segar (PANTONE 181 PC) menandakan ginjal normal, baik pada pengamatan 7 hari maupun 14 hari. Warna ginjal mencit kelompok dosis 840 mg/kg bb berwarna merah kecoklatan dan terlihat lebih gelap dibanding mencit

kontrol normal (PANTONE 1815 PC), baik pada pengamatan 7 hari maupun 14 hari, sedangkan warna ginjal mencit kelompok dosis 2150 mg/kg bb berwarna merah coklat gelap (PANTONE 483 PC), baik pada pengamatan 7 hari maupun 14 hari (Gambar 4.7 dan 4.8).

Perbedaan warna organ ginjal juga kemungkinan disebabkan oleh kongesti pada organ tersebut. Hasil makroskopik organ ginjal mencit kontrol normal dan perlakuan disajikan pada Gambar 4.7 dan 4.8; Tabel 4.4, 4.8 dan 4.10.

Tabel 4.4 Data persen berat basah ginjal terhadap bobot tubuh mencit tiap perlakuan

Kelompok Perlakuan	Persen Berat Basah Ginjal terhadap bobot tubuh \pm SD (%)
Kontrol normal	1,37 \pm 0,17
Dosis I	1,96 \pm 0,21
Dosis II	1,69 \pm 0,05

Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Dari Tabel 4.4 terlihat bahwa persen berat basah hati terhadap bobot tubuh mencit antar kelompok perlakuan memiliki perbedaan. Hal ini menunjukkan bahwa *reference toxicant* menimbulkan kerusakan pada ginjal mencit dilihat dari peningkatan berat ginjal mencit dan kongesti yang dapat dilihat secara makroskopik sama halnya seperti pada pengamatan makroskopik organ hati.

4.7 Pemeriksaan Mikroskopik Organ

Selain pengamatan makroskopik organ, pengamatan mikroskopik organ juga diperlukan untuk melihat adanya pengaruh pemberian *reference toxicant* tembaga (II) sulfat pentahidrat terhadap bobot organ dan kelainan yang terjadi (OECD,2001a). Organ yang hati dan ginjal yang sudah diamati secara makroskopik kemudian dibuat preparat histologinya untuk dianalisa secara mikroskopik. Pengamatan jangka panjang dalam OECD 425 adalah 14 hari. Oleh karena itu, dilakukan pula uji toksisitas akut oral OECD 425 dengan pengamatan

14 hari sebagai data pembanding untuk melihat ada tidaknya perbedaan mikroskopik organ setelah uji toksisitas akut.

Proses pembuatan sediaan histologi dimulai dari fiksasi yang bertujuan untuk mengawetkan dan mencegah perubahan organ dengan menginaktivasi enzim autolisis dan membunuh bakteri. Larutan formalin dipilih sebagai cairan fiksatif karena merupakan cairan fiksatif umum, cepat berpenetrasi ke jaringan dan nukleus serta jaringan ikat akan terwarnai dengan baik. Tahap kedua adalah proses dehidrasi yang bertujuan menarik air dari dalam jaringan agar proses pembedaan jaringan dalam paraffin solid cair (yang tidak dapat bercampur dengan air) berlangsung dengan baik. Selanjutnya dilakukan infiltrasi dan penanaman dalam paraffin yang bertujuan untuk mencegah kerusakan jaringan sewaktu disayat. Jaringan yang telah tertanam disayat dengan ketebalan 3 μ m. Kemudian dilakukan penempelan pada gelas obyek. Paraffin yang tersisa di sekitar gelas obyek dilarutkan menggunakan larutan xilol. Tahap selanjutnya adalah hidrasi yang bertujuan agar jaringan dapat terwarnai. Pewarnaan jaringan menggunakan teknik Hematoksin dan Eosin yang merupakan larutan polar (hematoksin larut dalam air dan eosin larut dalam alkohol). Setelah diwarnai, air dihilangkan kembali dengan alkohol dan xilol agar sediaan histologis bertahan untuk waktu lama, kemudian dilakukan penjernihan dan pengamatan (Tanzil, 1996; Bevelander & Ramaley, 1979). Prosedur pembuatan preparat histologi jaringan dapat dilihat dalam Gambar 4.9.

4.7.1 Pemeriksaan Histologi Hati

Pada pemeriksaan histologi hati dapat dilihat beberapa parameter untuk melihat ada atau tidaknya kerusakan hati. Beberapa parameternya adalah derajat kerusakan sel hati dan diameter vena sentralis (Leeson & Thomas, 1990). Sel hati (hepatosit) digunakan sebagai parameter kerusakan karena sel hati memiliki peranan penting dalam metabolisme (Leeson & Thomas, 1990). Pelebaran vena sentralis digunakan untuk mengetahui derajat kerusakan sel hati.

4.7.1.1 Diameter Vena Sentralis

Diameter rata-rata hati mencit setelah masa pajanan larutan *reference toxicant* tembaga (II) sulfat pentahidrat adalah pada kelompok kontrol normal diperoleh $28,84 \pm 0,56 \mu\text{m}$; pada dosis 840 mg/kg bb diperoleh $41,83 \pm 0,94 \mu\text{m}$; dan pada dosis 2150 mg/kg bb diperoleh $33,86 \pm 1,04 \mu\text{m}$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.5, 4.9 dan 4.11; Gambar 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18 dan 4.19.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa kelompok kontrol normal memiliki rata-rata ukuran diameter terkecil dibandingkan dengan kelompok lainnya, yaitu sebesar $28,84 \mu\text{m}$ (Tabel 4.5). Hasil pengamatan mikroskopik memperlihatkan bahwa sel hati pada kelompok normal berbentuk polihedral dan batas antara sel terlihat jelas (Gambar 4.12 dan 4.13). Hasil pengamatan yang didapat sesuai dengan pernyataan Leeson & Thomas (1990) bahwa sel hati berbentuk polihedral, yang tersusun secara radial dalam lobulus hati dan batas antar sel terlihat dengan jelas serta memiliki satu atau dua inti berbentuk bulat atau lonjong, yang berada ditengah sel.

Tabel 4.5 Data rata-rata diameter vena sentralis hati mencit tiap perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Diameter Vena Sentralis Hati \pm SD (μm)
Kontrol normal	$28,84 \pm 0,56$
Dosis I	$41,83 \pm 0,94$
Dosis II	$33,86 \pm 1,04$

Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Pada kelompok perlakuan dosis 840 mg/kg bb menunjukkan kerusakan hati akibat pemberian larutan *reference toxicant*, baik pada pengamatan 7 hari maupun 14 hari (Gambar 4.14 dan 4.15). Ukuran rata-rata diameter vena sentralis pada kelompok dosis 840 mg/kg bb jauh lebih besar daripada kedua kelompok lainnya yaitu $41,83 \mu\text{m}$. Hasil pengamatan sesuai dengan pernyataan Leeson & Thomas (1990) yang menyatakan bahwa kerusakan hati diawali dari sel-sel endotel yang mengalami lisis pada vena sentralis, sehingga mengakibatkan

pelebaran vena sentralis. Pada kelompok perlakuan dosis 2150 mg/kg bb juga menunjukkan kerusakan hati. Ukuran rata-rata diameter vena sentralis pada kelompok ini lebih besar daripada kelompok kontrol normal namun masih lebih kecil dari kelompok dosis 840 mg/kg bb yaitu 33,86 μm (Gambar 4.16 dan 4.17).

Perbedaan antara kelompok kontrol normal dengan kedua kelompok lainnya menunjukkan bahwa terjadi kerusakan pada organ hati mencit yang diberi perlakuan dosis yang dilihat dari ukuran rata-rata diameter vena sentralis. Hal ini sesuai dengan teori yang dikemukakan sebelumnya bahwa kerusakan hati diawali dari sel-sel endotel yang mengalami lisis pada vena sentralis, sehingga mengakibatkan pelebaran vena sentralis.

4.7.1.2 Derajat Kerusakan Hati

Jumlah rata-rata kerusakan sel hati pada mencit setelah masa pajanan larutan *reference toxicant* tembaga (II) sulfat pentahidrat adalah pada derajat kerusakan <20% (nekrosis ringan) diperoleh oleh kelompok kontrol normal. Pada derajat kerusakan 20-40 % (nekrosis sedang) diperoleh kelompok perlakuan dosis 840 mg/kg bb, dan pada tingkat kerusakan >40% (nekrosis berat) diperoleh oleh kelompok perlakuan Dosis 2150 mg/kg bb. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.9 dan 4.11; Gambar 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18 dan 4.19.

Pada mencit kelompok kontrol normal, rata-rata derajat kerusakan hati adalah sekitar 5% (Gambar 4.12 dan 4.13). Hal ini diakibatkan adanya degenerasi melemak pada hepatosit yang mungkin disebabkan oleh pengaruh dari luar yaitu makanan atau dari mencit itu sendiri karena mencit yang digunakan bukan mencit *pathogen free animal* sehingga wajar jika ditemukan gangguan metabolisme yang bersifat tidak spesifik. Kerusakan yang terjadi pada kelompok dosis 840 mg/kg bb meliputi sel-sel endotel vena sentralis yang mengalami lisis, pelebaran diameter vena sentralis, terjadi pembendungan darah dan haemorrhage atau perdarahan pada jaringan (lebih sedikit dibanding dengan kelompok dosis 2150 mg/kg bb) (Gambar 4.14 dan 4.15). Pada kelompok dosis 2150 mg/kg bb kerusakan yang terjadi adalah kongesti, infiltrasi limfosit, dan nekrosis (Gambar 4.16 dan 4.17). Kerusakan hati pada kelompok mencit yang diberi perlakuan disebabkan karena

pusat homeostasis Cu ada di dalam hati dan sejumlah besar Cu diabsorpsi pertama kali di organ ini (Mercer, 2001).

4.7.2 Pemeriksaan Histologi Ginjal

Parameter utama yang digunakan untuk menganalisis adanya kerusakan ginjal adalah dengan pemeriksaan mikroskopis preparat jaringan ginjal terutama glomerulus sebagai alat filtrasi utama. Pemeriksaan ini dilakukan melalui pengukuran diameter glomerulus dan jarak ruang antara glomerulus dan kapsula bowmann.

4.7.2.1 Pengukuran rata-rata diameter glomerulus ginjal

Diameter rata-rata hati mencit setelah masa pajanan larutan *reference toxicant* tembaga (II) sulfat pentahidrat adalah pada kelompok kontrol normal diperoleh $23,80 \pm 0,95 \mu\text{m}$; pada dosis 840 mg/kg bb diperoleh $30,21 \pm 1,23 \mu\text{m}$; dan pada dosis 2150 mg/kg bb diperoleh $30,21 \pm 1,23 \mu\text{m}$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.6, 4.9 dan 4.11; Gambar 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 dan 4.27.

Tabel 4.6 Data rata-rata diameter glomerulus ginjal mencit tiap perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Diameter Glomerulus Ginjal \pm SD (μm)
Kontrol normal	$33,20 \pm 1,39$
Dosis I	$23,80 \pm 0,95$
Dosis II	$30,21 \pm 1,23$

Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Perbedaan antara kelompok kontrol normal dengan kedua kelompok lainnya menunjukkan bahwa terjadi kerusakan pada organ ginjal mencit yang diberi perlakuan dosis yang dilihat dari ukuran rata-rata diameter glomerulus ginjal. Hal ini sesuai dengan teori bahwa jika terjadi kerusakan pada glomerulus, maka akan terlihat adanya pengerutan akibat sel-selnya yang lisis dan mati. Bila terjadi pengerutan maka diameter glomerulus akan mengecil dan jarak ruang

Universitas Indonesia

antara glomerulus dan kapsula bowmann akan semakin membesar jika dibandingkan dengan kontrol normal (Himawan & Tim Patologi, 1994).

4.7.2.2 Pengukuran rata-rata jarak ruang antara glomerulus dan kapsula bowmann

Rata-rata jarak ruang antara glomerulus dan kapsula bowmann mencit setelah masa pajanan larutan *reference toxicant* tembaga (II) sulfat pentahidrat adalah pada kelompok kontrol normal diperoleh $1,48 \pm 0,24 \mu\text{m}$; pada dosis 840 mg/kg bb diperoleh $3,43 \pm 0,15 \mu\text{m}$; dan pada Dosis 2150 mg/kg bb diperoleh $2,35 \pm 0,25 \mu\text{m}$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.7, 4.9 dan 4.11; Gambar 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 dan 4.27.

Tabel 4.7 Data rata-rata jarak ruang antara glomerulus dan kapsula bowmann ginjal mencit tiap perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Jarak Ruang antara Glomerulus dan Kapsula Bowmann \pm SD (μm)
Kontrol normal	$1,48 \pm 0,24$
Dosis I	$3,43 \pm 0,15$
Dosis II	$2,35 \pm 0,25$

Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

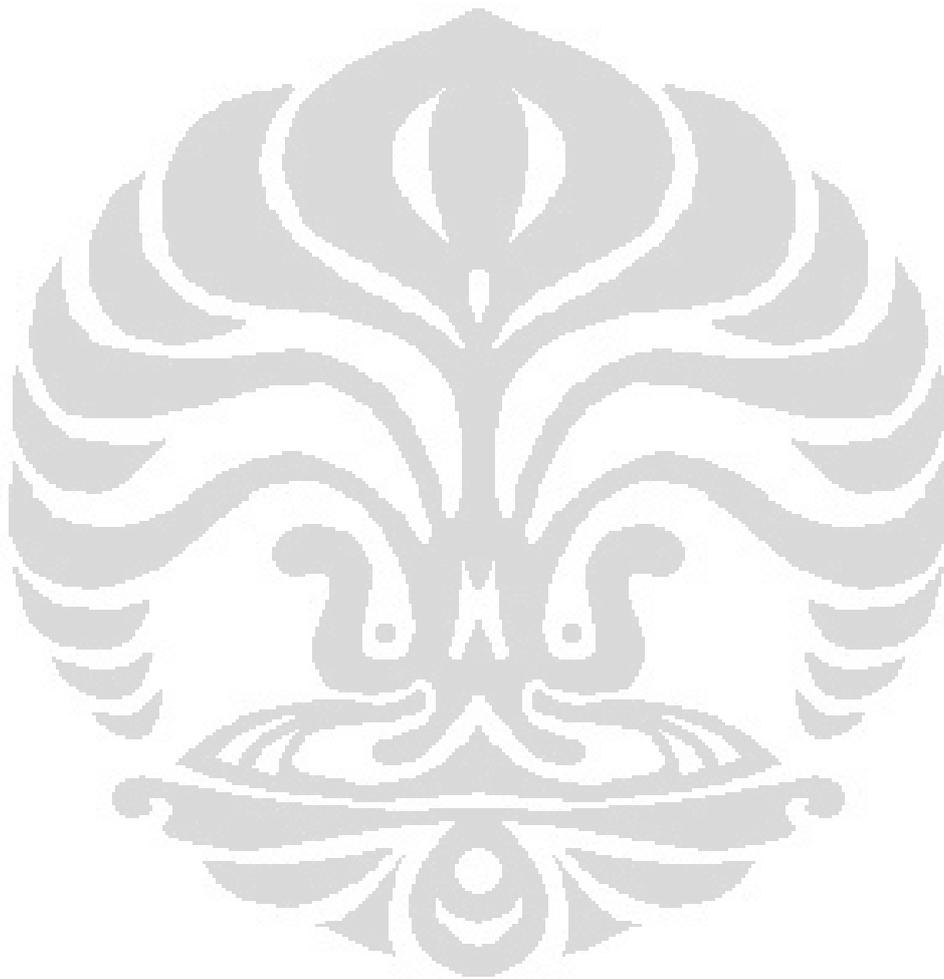
Perbedaan pada tiap kelompok tersebut sesuai dengan teori yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa jika terjadi kerusakan pada glomerulus, maka akan terlihat adanya pengerutan akibat sel-selnya yang lisis dan mati. Bila terjadi pengerutan maka diameter glomerulus akan mengecil dan jarak ruang antara glomerulus dan kapsula bowmann akan semakin membesar jika dibandingkan dengan kontrol normal (Himawan & Tim Patologi, 1994).

4.8 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini, terdapat keterbatasan yang dipengaruhi oleh adanya faktor-faktor seperti kemungkinan hewan uji yang mengidap penyakit lain atau hewan uji tidak berasal dari sumber yang baik sehingga membuat hasil pengamatan mikroskopik organ hati pada kelompok kontrol normal mengalami

Universitas Indonesia

kerusakan sebesar 5%, kemungkinan juga dari faktor makanan mencit yang kurang sesuai untuk kebutuhan nutrisi mencit, kemudian pengaruh kondisi ruangan (suhu ruangan yang berubah karena rusaknya *Air Conditioner* ketika dilakukan penelitian), dan kemungkinan bias pada saat pembacaan preparat histologis.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

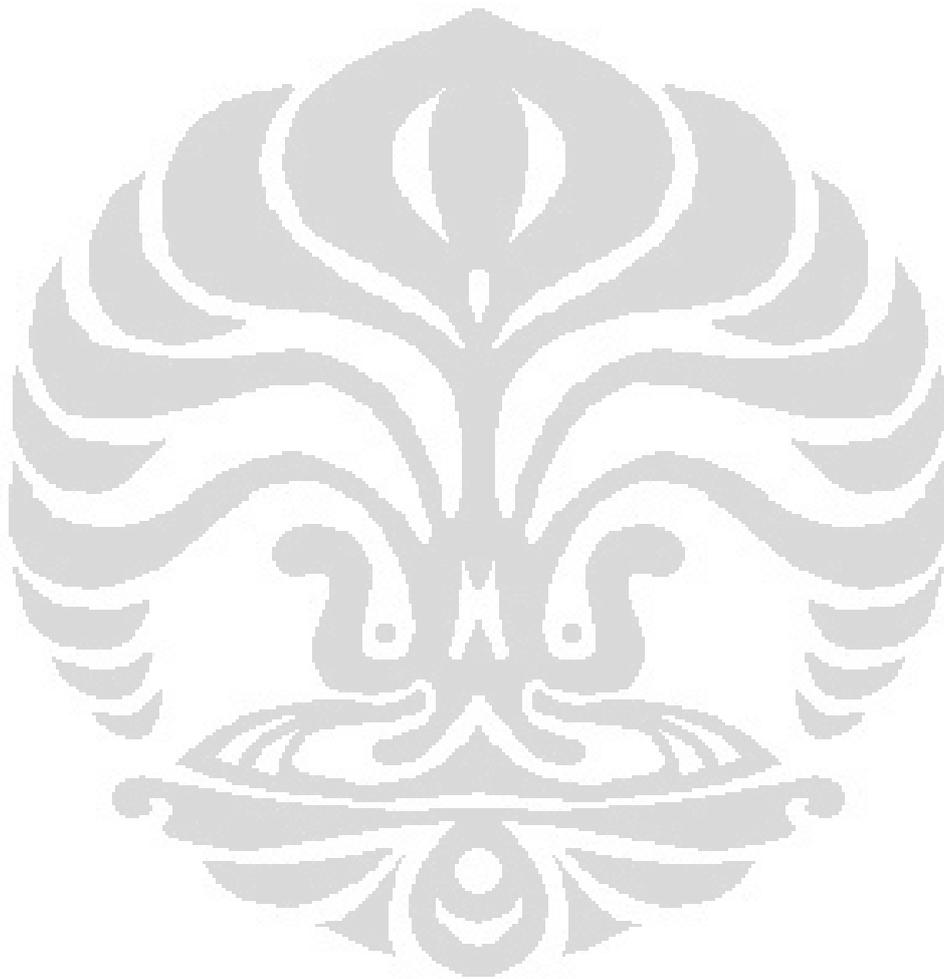
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan:

1. Metode pengujian toksisitas akut oral OECD 425 memenuhi persyaratan akurasi dan presisi sehingga dapat menjadi metode acuan untuk pengujian toksisitas akut oral limbah di Indonesia.
2. Hewan uji mencit dapat digunakan sebagai hewan uji untuk uji toksisitas akut metode OECD 425.
3. Tidak ada perbedaan hasil antar 7 hari pengamatan dengan 14 hari pengamatan pada uji toksisitas akut metode OECD 425 .
4. a. Pemberian larutan *reference toxicant* Tembaga (II) sulfat pentahidrat secara oral pada mencit dengan dosis 840 mg/kg bb, menyebabkan perubahan gambaran makroskopik dan mikroskopik hati dan ginjal yang ditandai dengan penambahan berat basah organ per bobot tubuh, sel-sel endotel vena sentralis yang mengalami lisis, pelebaran diameter vena sentralis, terjadi pembendungan darah dan kongesti, serta diameter glomerulus yang mengecil dibandingkan kontrol normal.

b. Pemberian larutan *reference toxicant* Tembaga (II) sulfat pentahidrat secara oral pada mencit dengan dosis 2150 mg/kg bb, menyebabkan perubahan gambaran makroskopik dan mikroskopik hati dan ginjal yang ditandai dengan penambahan berat basah organ per bobot tubuh, infiltrasi limfosit serta nekrosis dibandingkan kontrol normal.

5.2 Saran

1. Hewan uji yang digunakan untuk penelitian berikutnya disarankan berasal dari sumber yang baik dan bersertifikat untuk penelitian.
2. Perlu adanya *second observer* dalam pengamatan mikroskopik histologi organ untuk menghindari adanya bias dalam pembacaan.
3. Perlu dibuat komite etik sebagai persyaratan pengujian hewan di Pusarpedal – KLH.



DAFTAR ACUAN

- Adiwisastra, A. (1985). *Keracunan: sumber, bahaya serta penanggulangannya*. Bandung: Penerbit Angkasa, 63-64.
- Anderson, K. (1999). *Analytical Techniques for Inorganic Contaminants*. Gaithersburg : AOAC International.
- Arifin, Z. (2007). Pentingnya mineral tembaga (Cu) dalam tubuh hewan dalam hubungannya dengan penyakit. *Jurnal Wartazoa Vol. 17 No. 2 Thn 2007*, 93-94.
- ASTM (American Society for Testing and Materials) oleh Lee, D. R. (1980). Reference toxicants in quality control of aquatic bioassays. *Am. Soc. Test. Philadelphia: ASTM*.
- APHA. (1975). *Standard methods for the examination of waste*. Ed ke-2. American Public Health Association. Washington DC., 22-30.
- Barile, F.A. (2008). *Principles of toxicology testing*. Boca Raton: CRC Press, 75, 77-78.
- Baron, D.N. (1993). *Kapita selekta patologi klinik edisi IV*. Terj. Dari *A Short Textbook of chemical pathology 4th edition*, oleh Adrianto P & Gunawan J. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 109-111.
- Bevelander, G & Ramaley, JA. (1988). *Dasar-dasar histologi edisi VIII*. Terj. Dari *Essentials of histology 8th Edition*, oleh Gunarso W. Jakarta: Penerbit Erlangga, 287-298, 316-336.
- Burgess, C. (2000). *Valid Analytical Methods and Procedures*. UK: *The Royal Society of Chemistry*, 223.
- Cheville. (2006). Cell death and cell recovery in *Introduction to veterinary pathology 3th ed*. United State: Blackwell Publishing., 15-44.
- Darmono. (1995). *Logam dalam Sistem Biologi Makhluk Hidup*. Jakarta: UI-Press, 51-57.
- Dellman. (1992). *Buku teks histologi veteriner edisi III*. Terj. dari *Text Book of Hystology Veteriner* oleh R.Hartono. Jakarta: UI Press, 411-445.
- Dewi. (2011). Analisis cemaran logam timbal (Pb), tembaga (Cu), dan kadmium (Cd) dalam tepung gandum secara spektrofotometri serapan atom. Skripsi Departemen Farmasi Universitas Indonesia, 16.

- Donatus, I.A. (2001). *Toksikologi dasar*. Yogyakarta: Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, 36.
- Dreisbach, R.H. (1982). *Handbook of poisoning: prevention, diagnosis, and treatment 11th edition*. California: Lange Medical Publications, 469.
- Fifield, F.W., & Kealey, D. (2000). *Principles and Practice of Analytical Chemistry*. London: University of Kingston, 446.
- Gad, S.C & Changelis, C.P. (1990). *Acute toxicology testing ed-2*. California: Academic Press, 170-178.
- Greaves, P. (2000). *Histopathology of preclinical toxicity studies interpretation and relevance in drug safety evaluation 2nd Ed*. Amsterdam : Elsevier Publisher, 372-380.
- Gunay, et al. (2006). A series of patients in the emergency department diagnosed with copper poisoning: recognition equals treatment. *Tohoku J Exp Med*, 209, 243-248.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. (1997). *Buku ajar fisiologi kedokteran edisi ke-9*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC., 156-168, 244-260.
- Hadi, A. (2007). *Pemahaman dan Penerapan ISO/IEC 17025:2005 Persyaratan Umum Kompetensi, Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama, 88-90.
- Harada, T., Enomoto, A., Boorman, G.A., Maronpot, R.R. (1999). Liver and gallbladder dalam *Pathology of the Mouse: Reference and Atlas 1th Ed* oleh Maronpot R.R.. Cache River Press., 119-135.
- Himawan S. & Tim Patologi. (1996). *Kumpulan kuliah patologi FK UI*. Jakarta: Bagian Patologi Anatomi FK UI, 281-282.
- Hodgson, E. (2010). *A Textbook of modern toxicology 4th edition*. North Carolina : A John Wiley & Sons. Inc., Publication, 225 – 236.
- Horwitz, W. (1975). *Official Methods of Association of Officials Analytical Chemistry*. 12th ed. New York: McGraw-Hill, 224.
- Inoue, Y., T. Osawa, A. Matsui, Y. Asai, Y. Murakami, T. Matsui, dan H. Yano. (2002). Changes of serum mineral concentration in horses during exercise. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 15(4), 531-536.
- Jin H, Yang X, Yin D, & Yu H. (1999). A case study on identifying the toxicant in effluent discharged from a chemical plant. *Buletin Marine Pollution*, 39, 122.

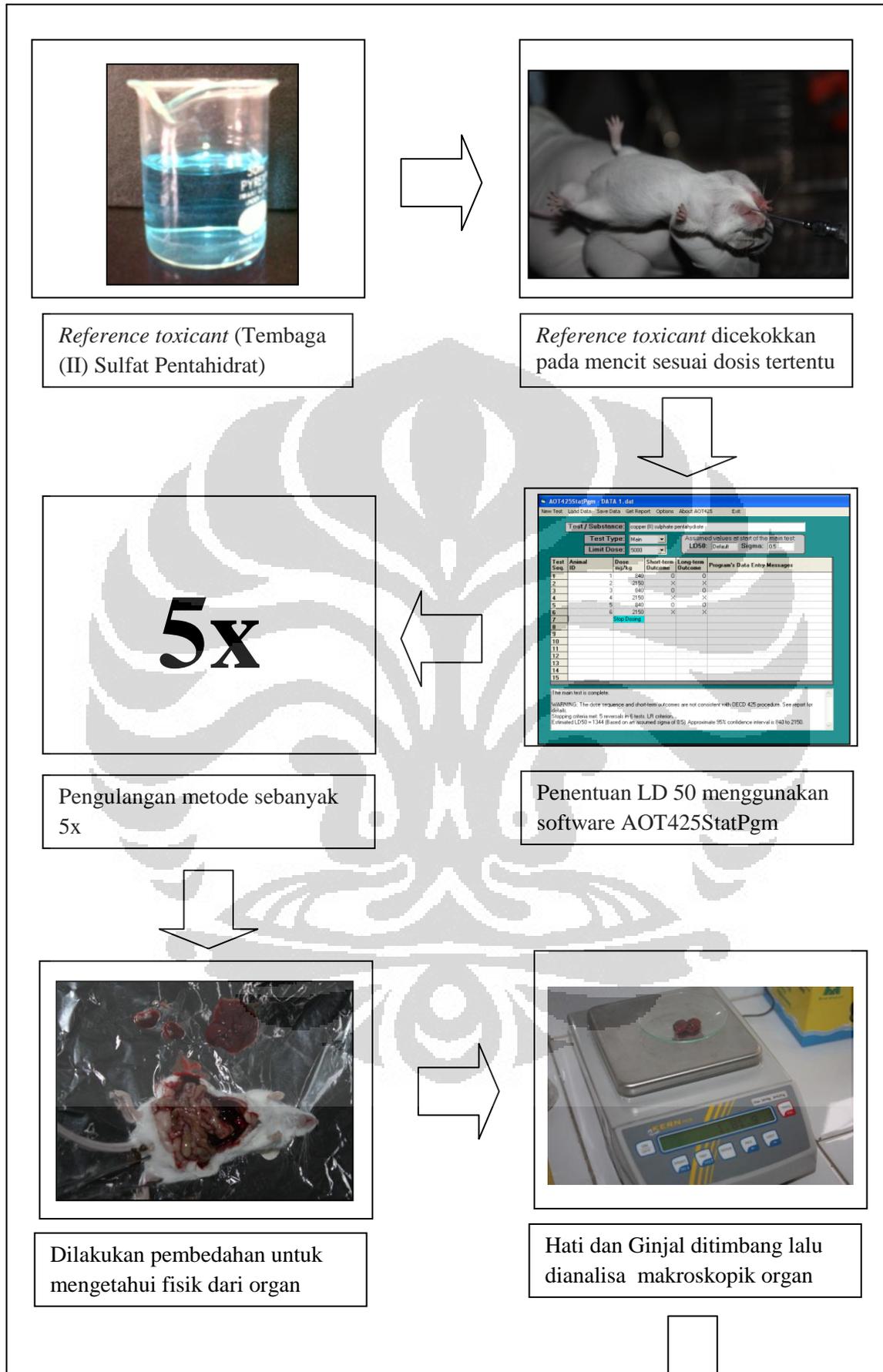
- Jop, K. M., Rodgers, J. H., Dorn, P. B., & Dickson, K. L. (1986). Use of hexavalent chromium as a reference toxicant in aquatic toxicity tests. In T. M. Poston & R, 6-12.
- Khopkar, S. M. (1990). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: Universitas Indonesia Press, 88.
- Kementrian Perindustrian Republik Indonesia. (2011). Media industri: industrialisasi untuk kehidupan yang lebih baik No. 01.2011. Jakarta: Biro Umum dan Hubungan Masyarakat Kementerian Perindustrian., 16.
- Lee, D. R. (1980). Reference toxicants in quality control of aquatic bioassays. *Am. Soc. Test. Mater., Spec. Tech. Publ.*, 188-199.
- Leeson, C.R & Thomas, S.L. (1990). *Buku ajar histologi*. Edisi V (terj) oleh Staf Ahli Histologi FKUI. Jakarta: Buku Kedokteran EGC, 159-168, 198-203, 383-395, 407-425 dan 427-450.
- Loomis, T. A. (2001). *Toksikologi dasar* (edisi 3) .Terj. dari *Essentials of Toxicology*, oleh Imono Argo Donatus. Semarang: IKIP Semarang Press, 225-233.
- Lu, F.C. (2009). *Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs, and Risk Assesment 5th ed.* New York: Informa Healthcare USA, Inc., 85, 108, 188-190.
- Mercer, J.F. (2001). The molecular basis of copper transport diseases. *TRENDS in Molecular Medicine Vol 7 No. 2 Feb*, 64-66
- NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences). (1997). *Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods*. California: NIH Publication, 10. <http://iccvam.niehs.nih.gov/parts/iccvam.html>
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). (1987). *OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Test No. 401: Acute Oral Toxicity*. Paris: OECD, 1-6.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). (2001a). *OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*. (<http://lysander.sourceoecd.org/>). Paris: OECD, 1-26.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). (2001b). *OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Test No. 420: Acute Oral Toxicity: Fixed Dose Procedure*. Paris: OECD, 4-8.

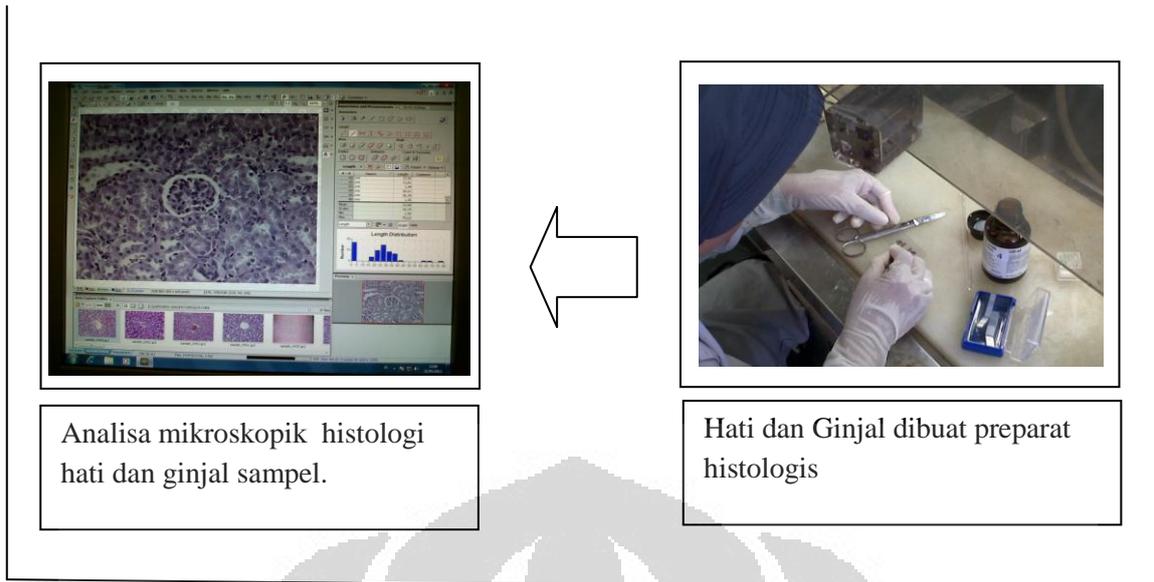
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). (2001c) OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Test No. 423: Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method. Paris: OECD, 3-6.
- Peraturan Pemerintah No. 18 tahun 1999 tentang Pengelolaan Limbah Bahan Berbahaya dan Beracun. Jakarta: Menteri Negara Sekretaris Negara Republik Indonesia.
- Peraturan Pemerintah 85 tahun 1999 tentang Perubahan Atas Peraturan Pemerintah No. 18 Tahun 1999 Tentang Pengelolaan Limbah Bahan Berbahaya Dan Beracun. Jakarta: Menteri Negara Sekretaris Negara Republik Indonesia.
- Pusarpedal. (2012). *Sekilas Mengenai Pusarpedal*. 24 Januari 2012. (<http://www.pusarpedal.mlh.go.id>)
- Rispin, A., et al. (2002). "Alternative methods for the median lethal dose (LD₅₀) test: the up-and-down procedure for acute oral toxicity." *Institute of laboratory animal resources journal* 43(4), 233-43.
- Robin, S.L & V.M.D Kumar. (1995). *Patologi*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 556-560.
- Schelde E, Elke, horst, Gisela, & Detlev. (2005). Oral acute toxic class method: a successful alternative to the oral LD₅₀ test. *Jour. Reg. Toxic. and Pharm* 42, 15-23.
- Seely, J.C. (1999). Kidney dalam *Pathology of the Mouse: Reference and Atlas 1th* Ed oleh Maronpot R.R. Cache River Press., 119-135.
- Sherwood. L. (2001). *Fisiologi manusia: dari sel ke sistem*. Terj. Dari *Human Physiology: from Cells to Systems*. Alih bahasa: Brahm U. Pendit. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 568, 570.
- Sinkovic A, Strdin A, Svenssek F. (2008). Severe acute copper sulphate poisoning: a case report. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 2008 : 59, 31-32.
- Sinta, M.S, (2007). Logam berat dan antagonis. Dalam Sulistia Gan Gunawan, Rianto Setiabudy, Nafrialdi, dan Elysabeth (Ed.). *Farmakologi dan terapi* (hal 481-495). (Ed. ke-5). Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 854-855.
- Sitzel, K & G. Carr. (1999). Statistical basis for estimating acute oral toxicity comparison of OECD guidelines 401, 420, 423, and 425. Up-andDown Procedure Peer Panel Report, O3-O10.
- Spector, W.G., Spector, T.D. (1993). *Pengantar Patologi Umum Edisi ke-3*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press., 44-48.

- Tanzil R. (1996). *Berbagai Masalah Pembuatan Sediaan Histologis*. Bagian Histologis Fakultas Kedokteran UI, 56-62.
- Tortora GJ. & Nicholas PA. (1990). *Principles of Anatomy and Physiology 6th Edition*. New York: Biological Science Textbooks Inc, A and P Textbooks Inc & Elia-Sparta Inc., 825-841.
- U.S. EPA (2002a). Health effects test guidelines OPPTS 870.1100 Acute Oral Toxicity. US Environmental Protection Agency, Document no. EPA/712/C- 02/190, Washington, DC, USA, 22-24.
- U.S. EPA (2002b). A review of the reference dose and reference concentration processes. US Environmental Protection Agency, Document no. EPA/630/P- 02/002F, Washington, DC, USA, 5.
- U.S. EPA (2002c). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. US Environmental Protection Agency, Document no. EPA/821/R-02/012, Washington, DC, USA, 1-12.
- Westat. (2001). *Acute oral toxicity software program; AOT425StatPgm; AOT425StatPgm Program User's Manual; and Simulation Results for the AOT425StatPgm Program*. 12 Februari 2012. (http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/updocs/udprpt/udp_ciprop.htm).
- Whitehouse, P. (2001). Measures for protecting water quality: current approaches and future developments. *Jour. Ecotox. and Env. Safe.*, 50, 115.
- Widaningrum, Miskiyah & Suismono. (2007). *Bahaya kontaminasi logam berat dalam sayuran dan alternatif pencegahan cemarannya*. Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian Vol. 3 2007, 4-6.
- William PL , Burson JL. (1995). *The basic science of toxicity*. Ed ke-3. Macmillan Publ.Co, New York, 54.
- Yossa, I. (2008). Profil toksisitas limbah kerak kilang minyak (green coke) terhadap mencit (*Mus musculus*). *Thesis Program Studi Biokimia Institut Pertanian Bogor*, 4-10, 24-32.
- Zimmerman., H.J. (1982). *Chemical hepatic injury and its detection in toxicology of the liver*. Eds. GL. Plaa and WR. Hewitt. New York: Raven Press, 198-200.



GAMBAR

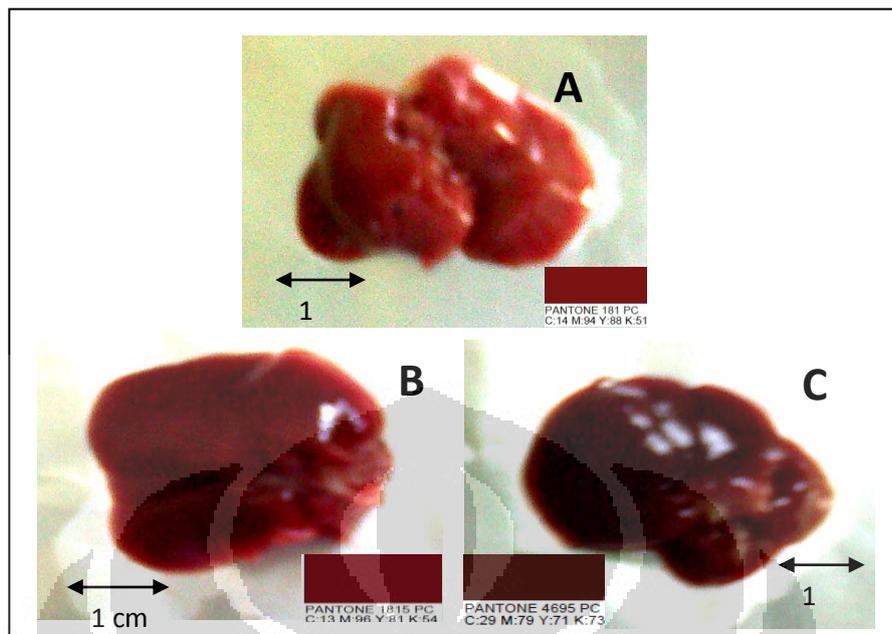




Gambar 4.1. Tahap-tahap penelitian

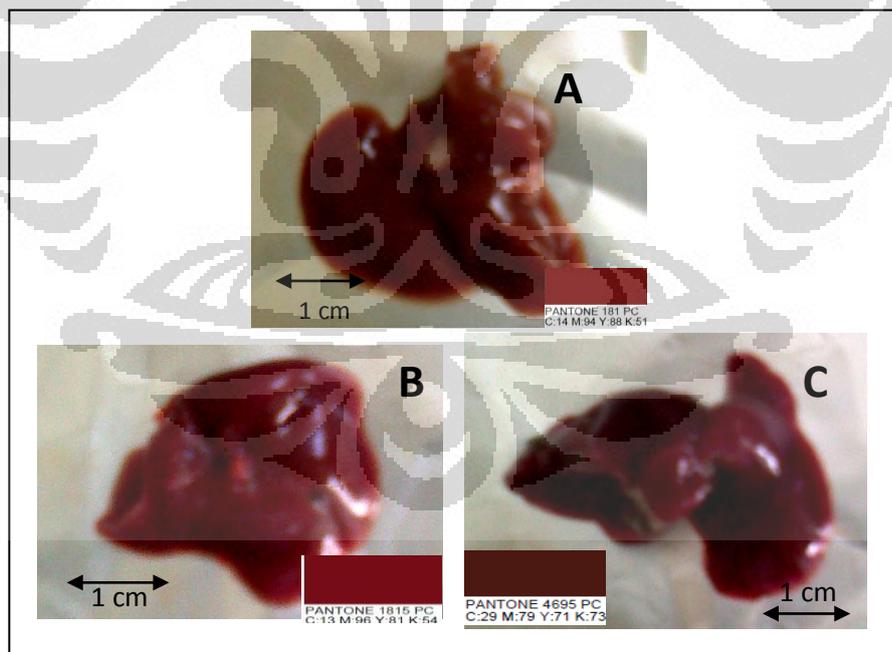


Gambar 4.2. Serbuk Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat



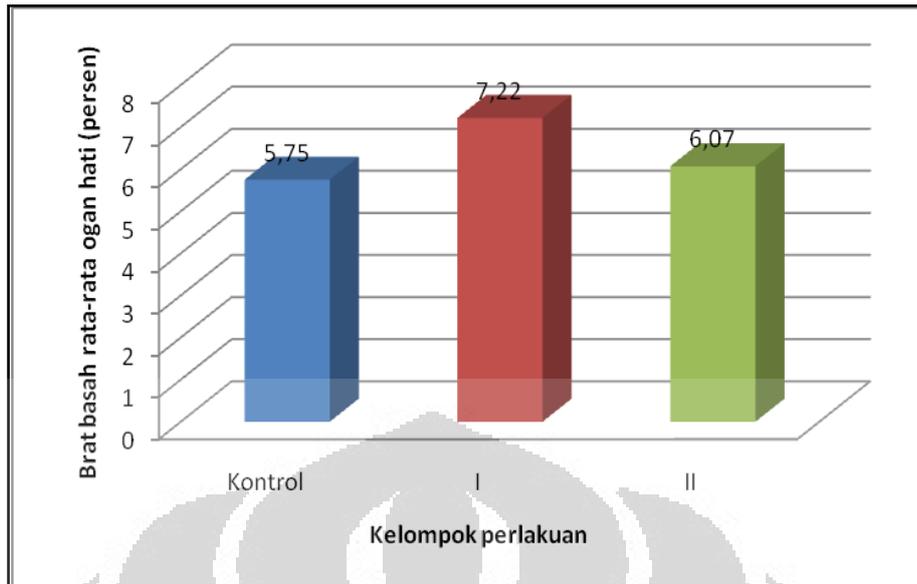
Keterangan: A = mencit kelompok kontrol, B = mencit kelompok perlakuan dosis 840 mg/kg bb, C = mencit kelompok perlakuan dosis 2150 mg/kg bb

Gambar 4.5. Morfologi hati mencit tiap perlakuan pada pengamatan 7 hari



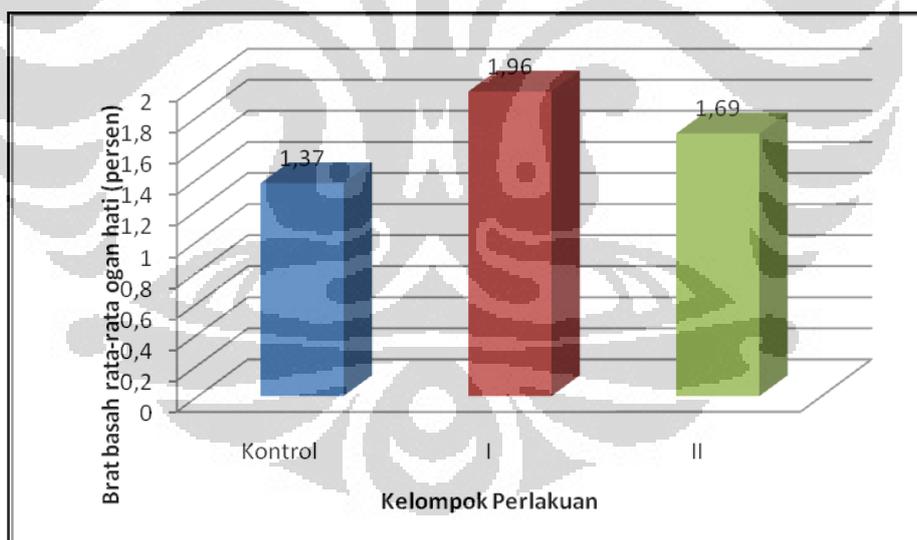
Keterangan: A = mencit kelompok kontrol, B = mencit kelompok perlakuan dosis 840 mg/kg bb, C = mencit kelompok perlakuan dosis 2150 mg/kg bb

Gambar 4.6. Morfologi hati mencit tiap perlakuan pada pengamatan 14 hari



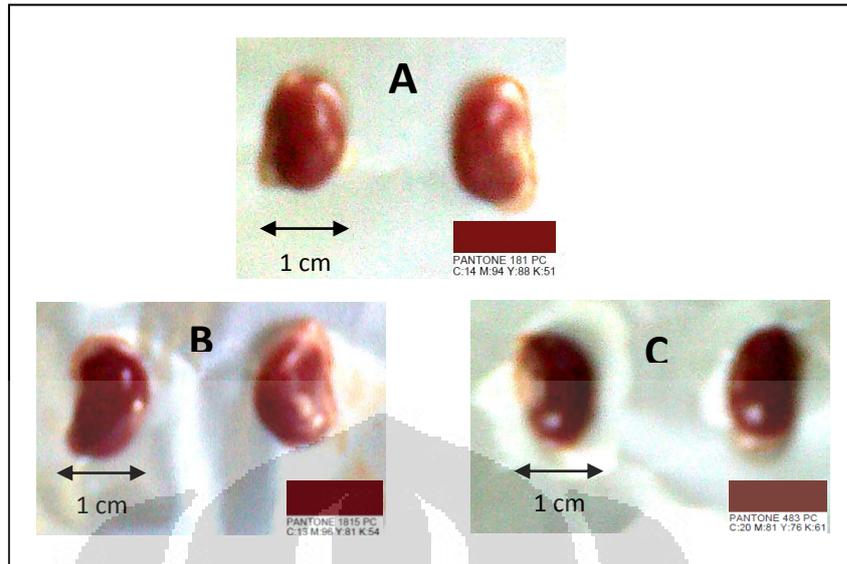
Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Gambar 4.7. Diagram batang persen bobot basah rata-rata organ hati terhadap bobot tubuh mencit tiap perlakuan



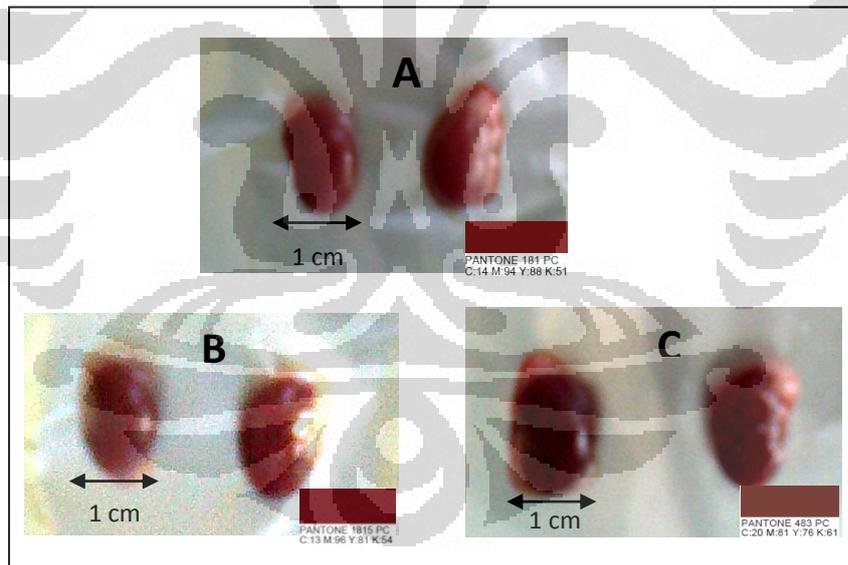
Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Gambar 4.8 Diagram batang persen bobot basah rata-rata organ ginjal terhadap bobot tubuh mencit tiap perlakuan



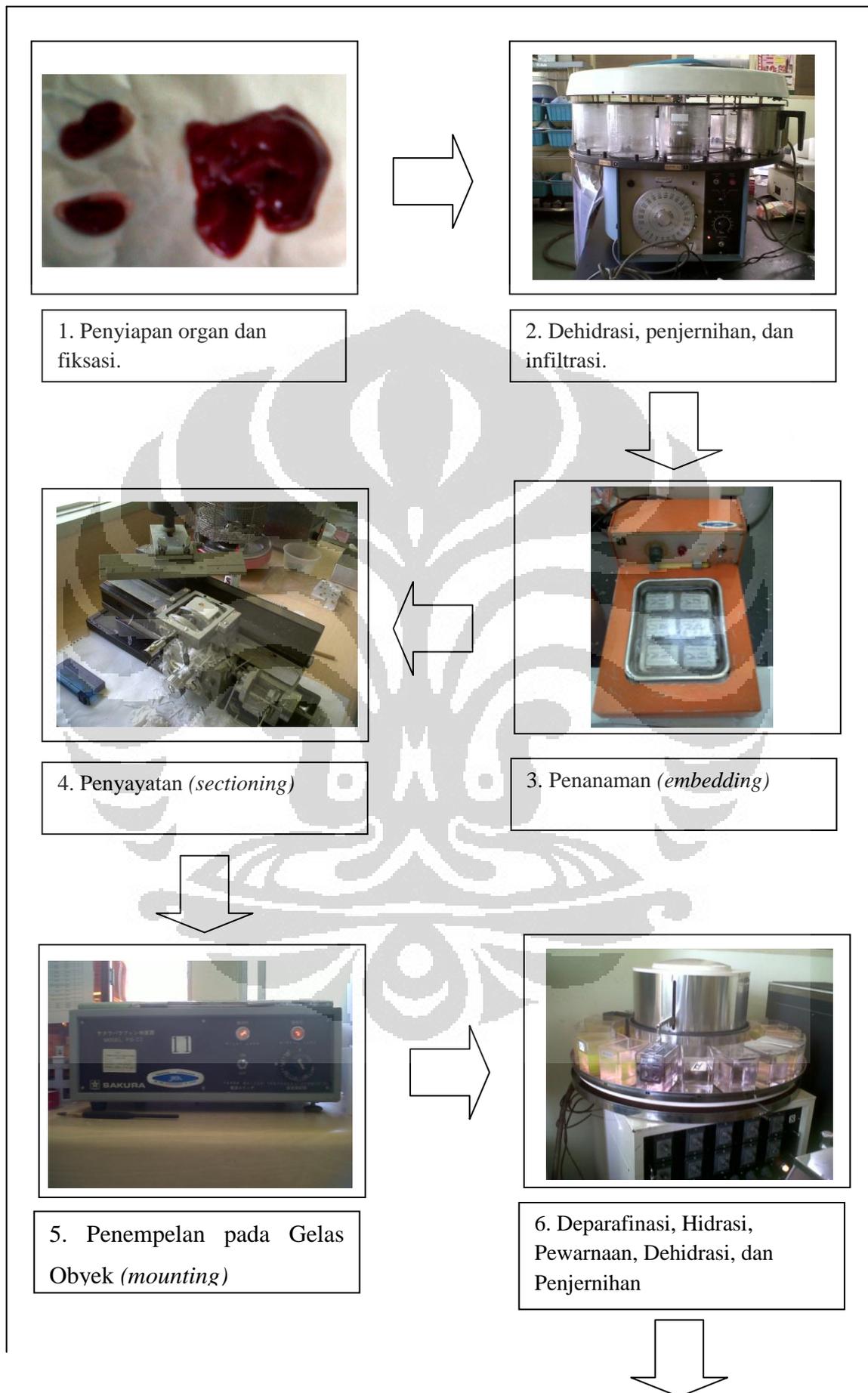
Keterangan: A = mencit kelompok kontrol, B = mencit kelompok perlakuan dosis 840 mg/kg bb, C = mencit kelompok perlakuan dosis 2150 mg/kg bb

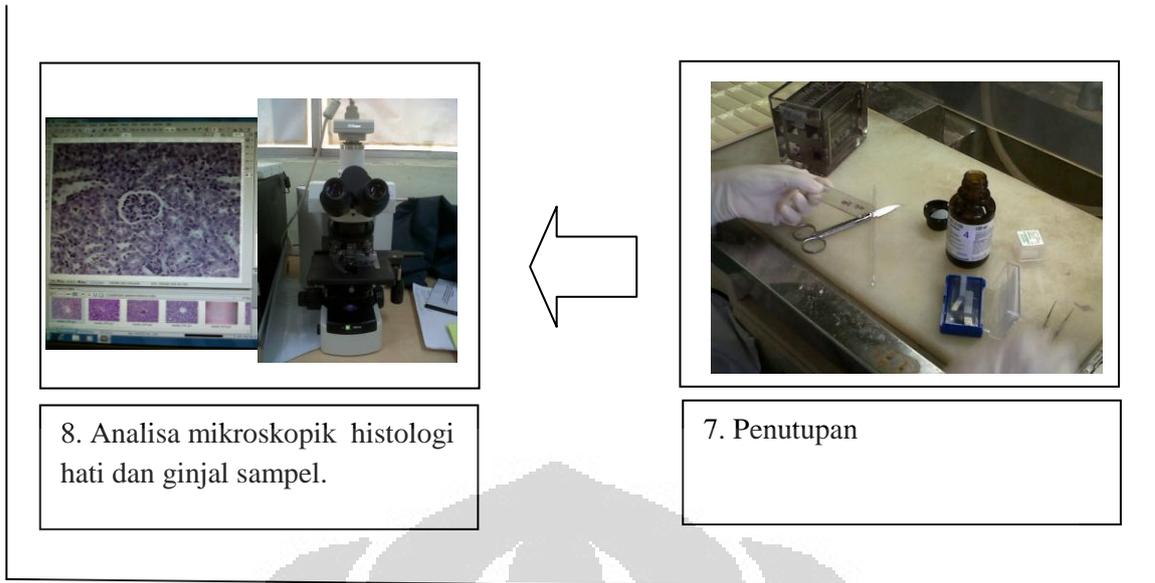
Gambar 4.9 Morfologi ginjal mencit tiap perlakuan pada pengamatan 7 hari



Keterangan: A = mencit kelompok kontrol, B = mencit kelompok perlakuan dosis 840 mg/kg bb, C = mencit kelompok perlakuan dosis 2150 mg/kg bb

Gambar 4.10 Morfologi ginjal mencit tiap perlakuan pada pengamatan 14 hari

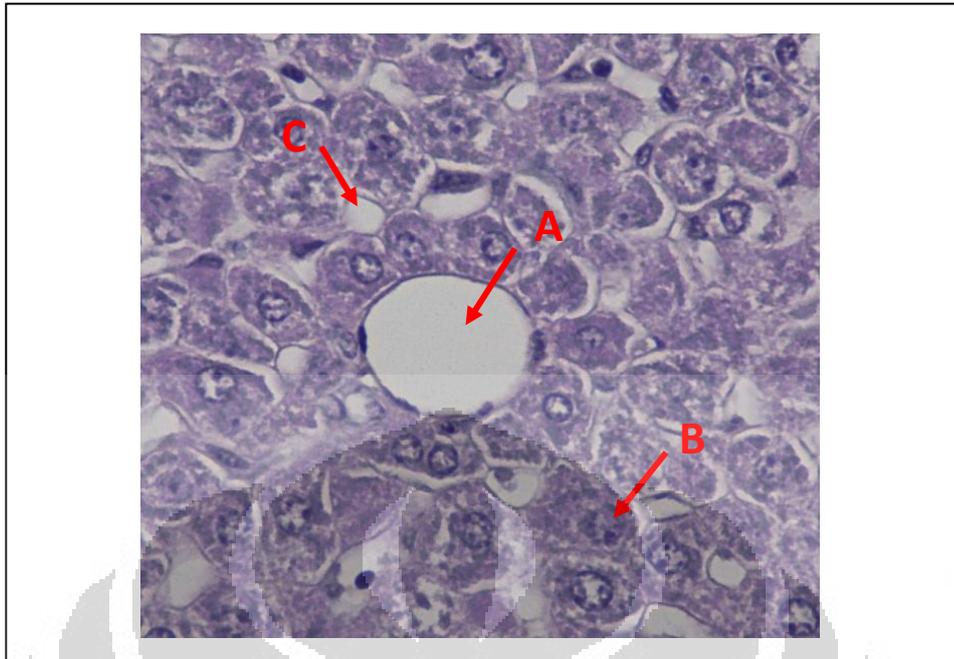




Gambar 4.11 Prosedur histologi jaringan

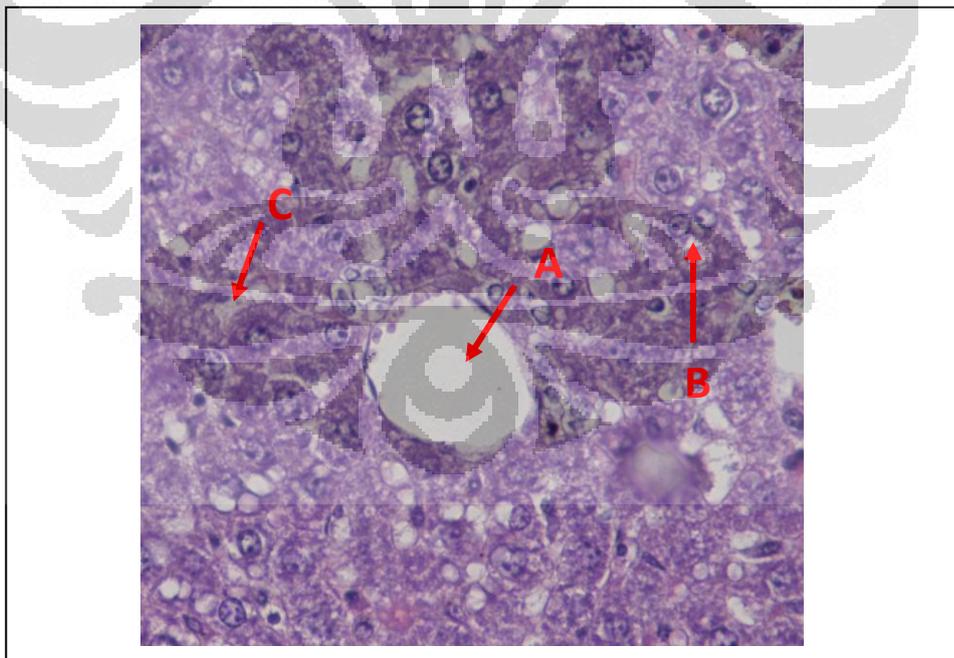
Keterangan Alat :

2. *Automatic Rotary Tissue Processor* (Sakura RH 12 DM II)
3. Mikrotom Geser (Yamato Kohki)
4. *Paraffin Hot Vat* (Hirasawa)
5. *Slide warmer* (Sakura model PS-C2)
6. *Ultra Histo Dyer* (Sakura)
8. Mikroskop Nikon Eclipse 80i dan program NIS Elements D 4.00.00



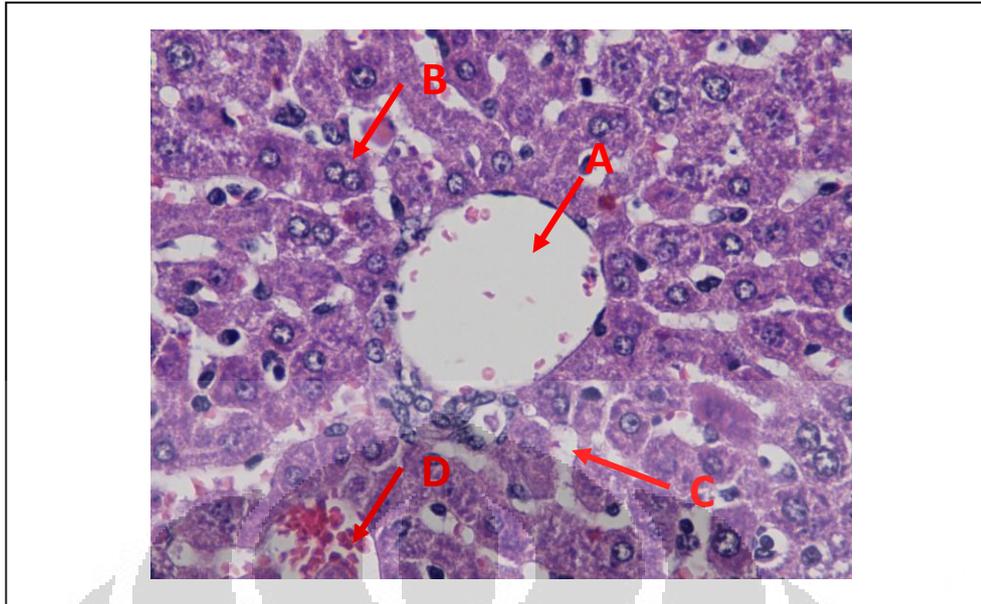
Keterangan: A = vena sentralis dengan sel endotel normal, B = Hepatosit (sel hati) dengan inti sel normal, C = sinusoid. Perbesaran 400 x

Gambar 4.12 . Gambaran histologis hati mencit kontrol normal pada pengamatan 7 hari.



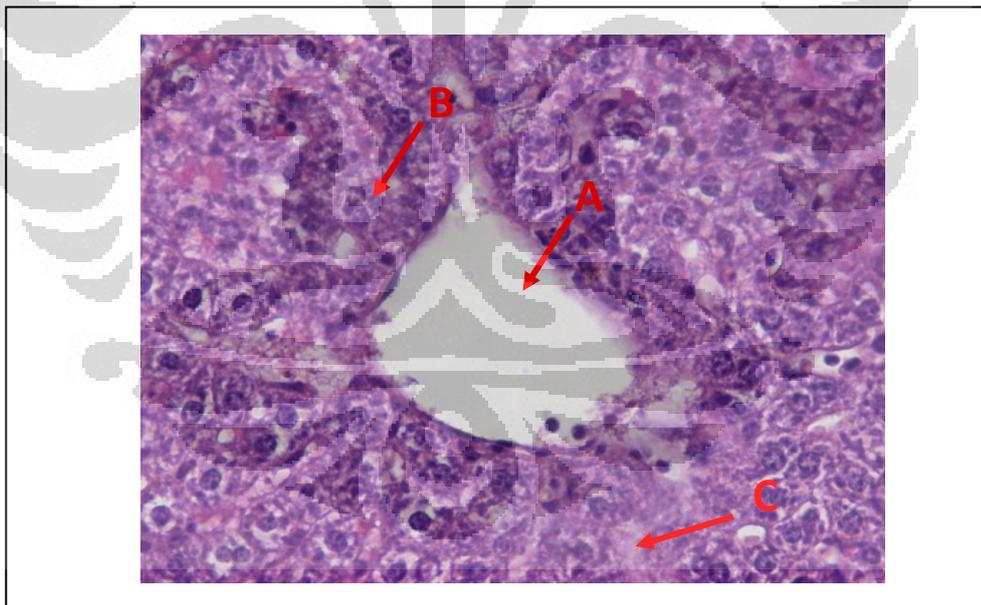
Keterangan: A = vena sentralis dengan sel endotel normal, B = Hepatosit (sel hati) dengan inti sel normal, C = sinusoid. Perbesaran 400 x.

Gambar 4.13 . Gambaran histologis hati mencit kontrol normal pada pengamatan 14 hari



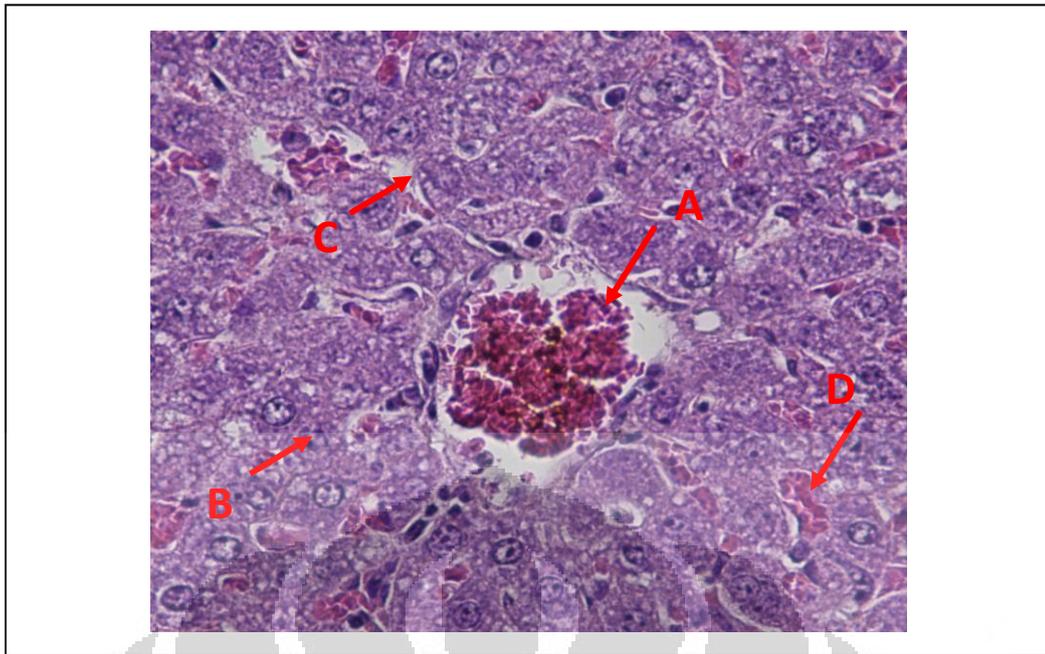
Keterangan: A = vena sentralis dengan sel endotel lisis, B = Hepatosit (sel hati) dengan inti sel mengerut, C = sinusoid yang melebar, D = haemorrhage.

Gambar 4.14. Gambaran histologis hati mencit dosis 840 mg/kg bb dengan perbesaran 400 x pada pengamatan 7 hari



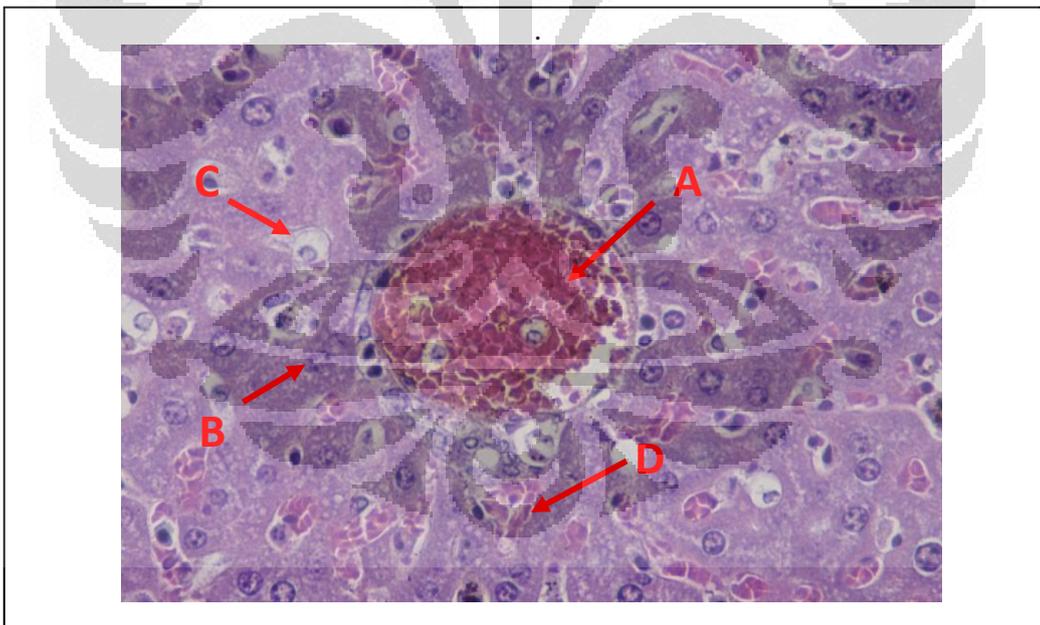
Keterangan: A = vena sentralis dengan sel endotel lisis, B = Hepatosit (sel hati) dengan inti sel mengerut, C = sinusoid yang melebar.

Gambar 4.15. Gambaran histologis hati mencit dosis 840 mg/kg bb dengan perbesaran 400 x pada pengamatan 14 hari.



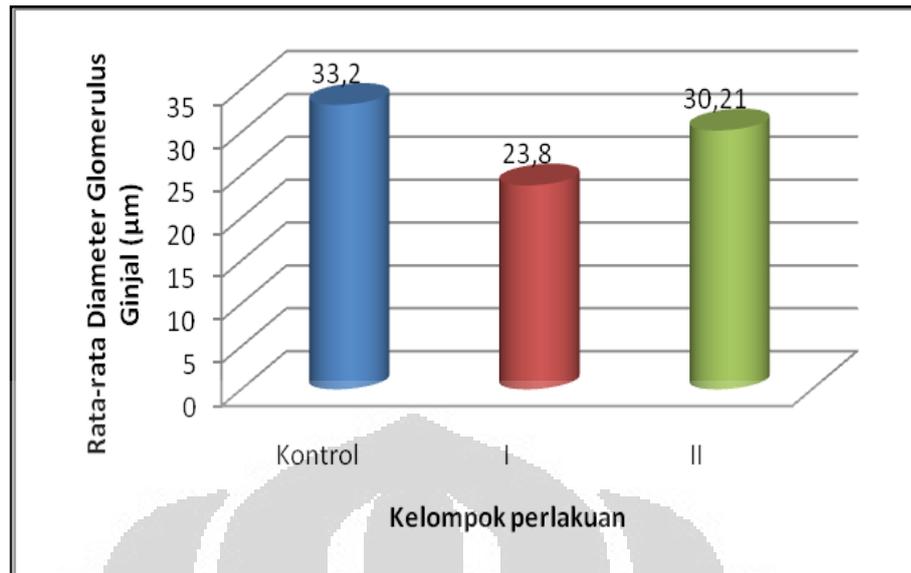
Keterangan: A = vena sentralis dengan sel endotel lisis dan timbul kongesti, B = Hepatosit (sel hati) dengan inti sel mengerut, C = sinusoid yang melebar, D = haemorrhage.

Gambar 4.16 . Gambaran histologis hati mencit dosis 2150 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 7 hari



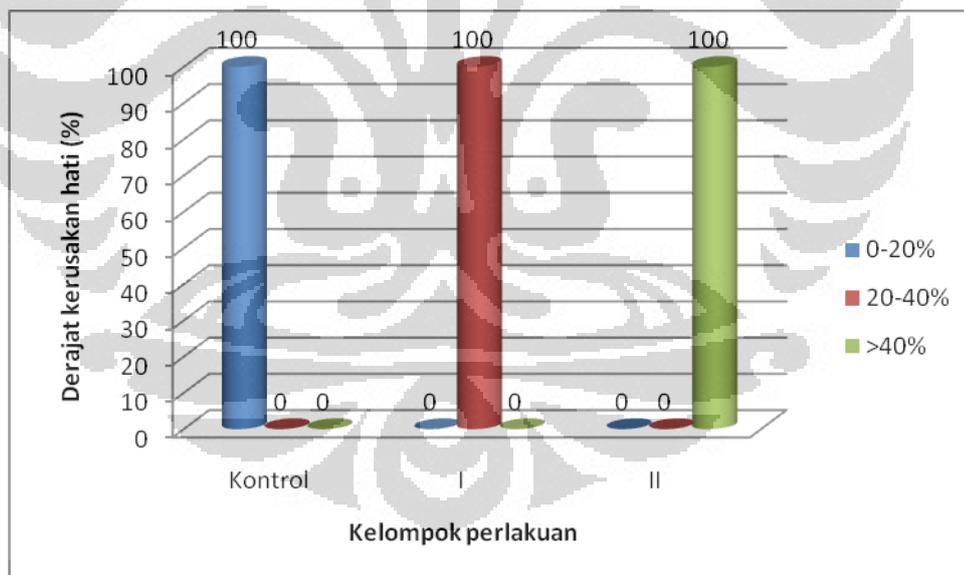
Keterangan: A = vena sentralis dengan sel endotel lisis dan timbul kongesti, B = Hepatosit (sel hati) dengan inti sel mengerut, C = sinusoid yang melebar, D = haemorrhage.

Gambar 4.17 . Gambaran histologis hati mencit dosis 2150 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 14 hari.



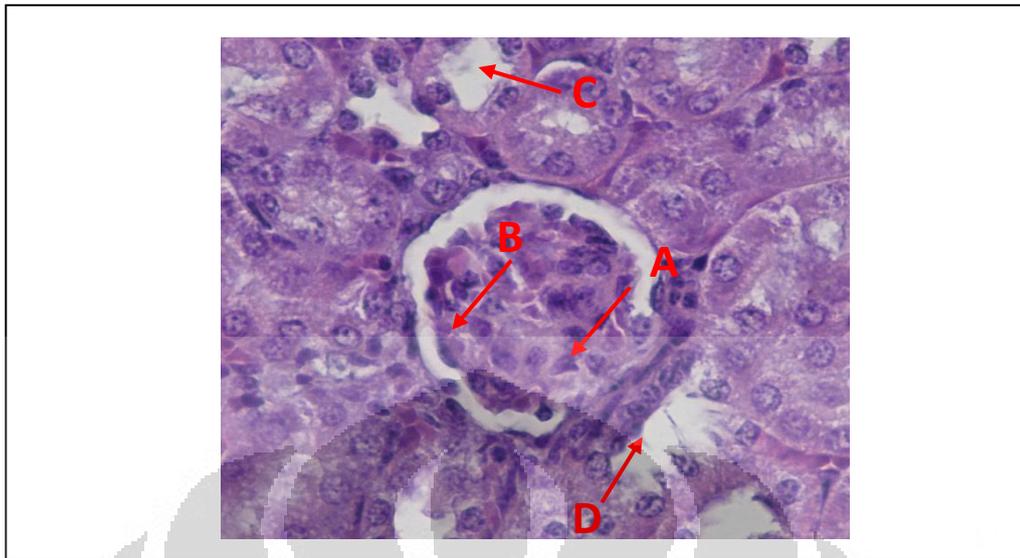
Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Gambar 4.18 Diagram batang persen rata-rata diameter vena sentralis hati mencit tiap perlakuan



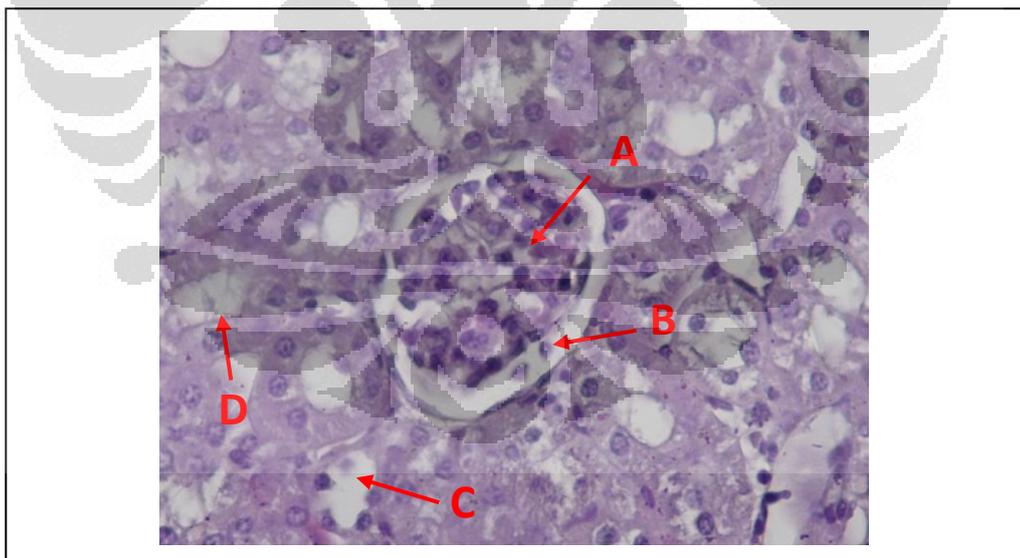
Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb

Gambar 4.19 Diagram batang persentase derajat kerusakan hati mencit tiap perlakuan



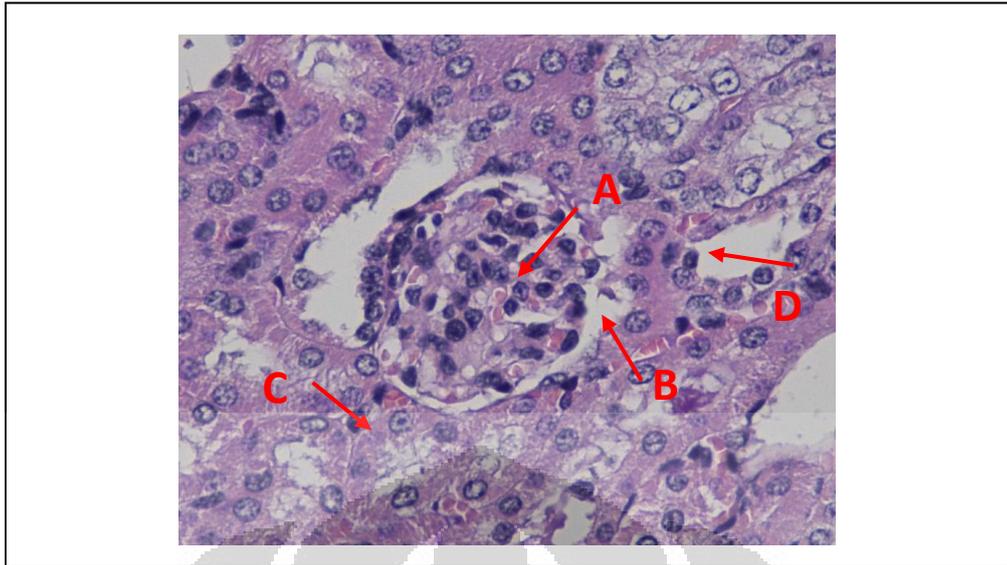
Keterangan: A = glomerulus normal, B = ruang antara glomerulus dan kapsula bowmann normal, C= tubulus distal normal, D= tubulus proksimal normal

Gambar 4.20. Gambaran histologis kompleks jukstaglomerulus ginjal mencit kontrol normal dengan perbesaran 400x pada pengamatan 7 hari.



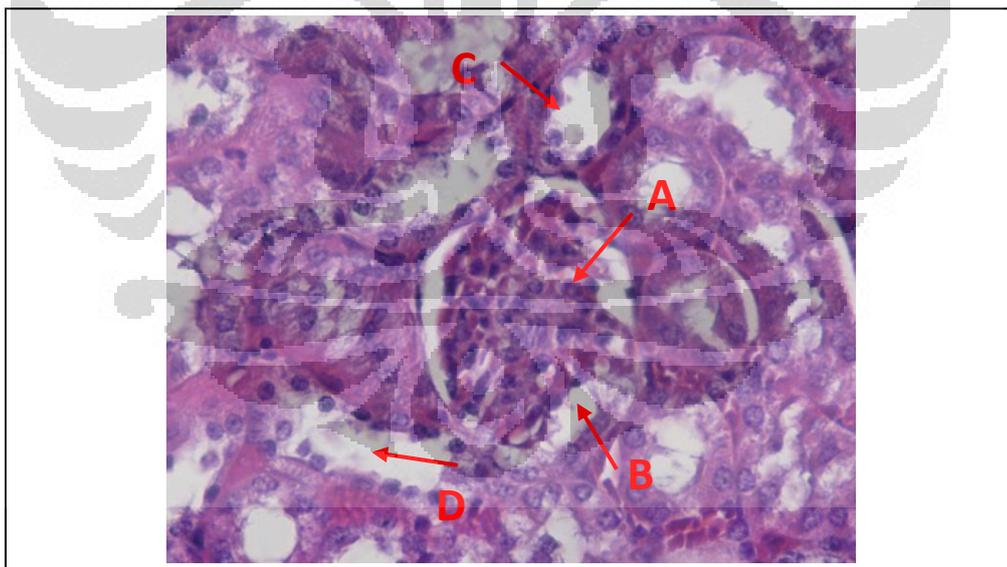
Keterangan: A = glomerulus normal, B = ruang antara glomerulus dan kapsula bowmann normal, C= tubulus distal normal, D= tubulus proksimal normal

Gambar 4.21. Gambaran histologis kompleks jukstaglomerulus ginjal mencit kontrol normal dengan perbesaran 400x pada pengamatan 14 hari.



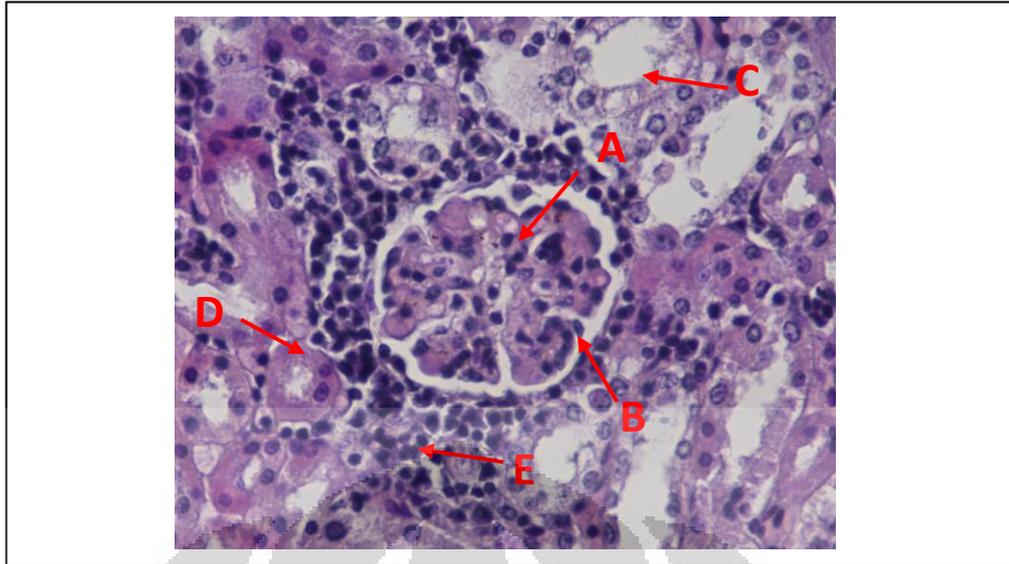
Keterangan: A = glomerulus, B = ruang antara glomerulus dan kapsula bowmann normal yang melebar, C= degenerasi tubulus distal, D= degenerasi tubulus proksimal

Gambar 4.22. Gambaran histologis kompleks jukstaglomerulus ginjal mencit dosis 840 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 7 hari.



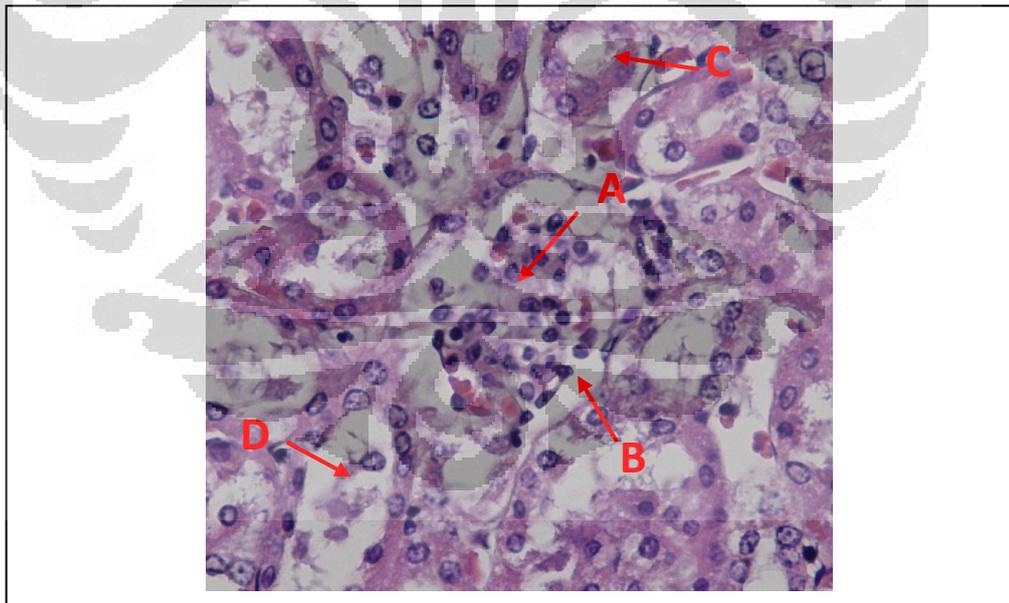
Keterangan: A = glomerulus, B = ruang antara glomerulus dan kapsula bowmann normal yang melebar, C= degenerasi tubulus distal, D= degenerasi tubulus proksimal

Gambar 4.23 . Gambaran histologis kompleks jukstaglomerulus ginjal mencit dosis 840 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 14 hari.



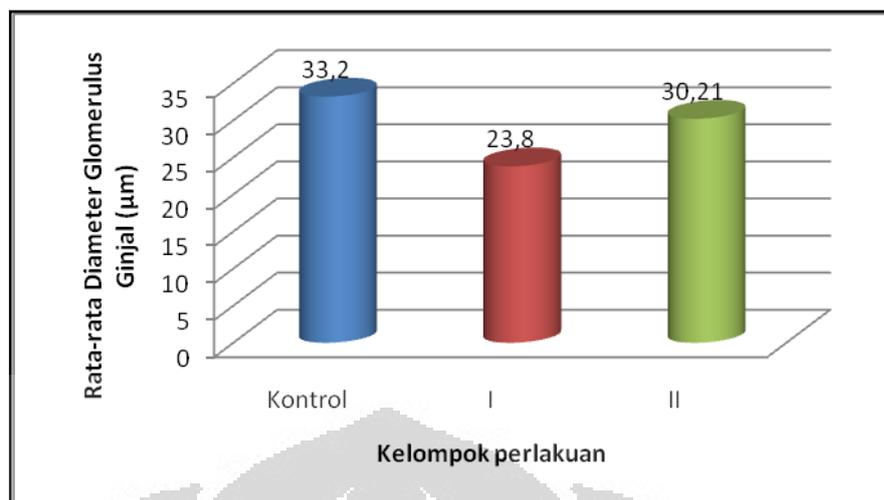
Keterangan: A = glomerulus yang mengalami pengerutan, B = ruang antara glomerulus dan kapsula bowmann, C= degenerasi tubulus kontortus distal, D= degenerasi tubulus kontortus proksimal, E= infiltrasi limfosit.

Gambar 4.24. Gambaran histologis kompleks jukstaglomerulus ginjal mencit dosis 2150 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 7 hari.



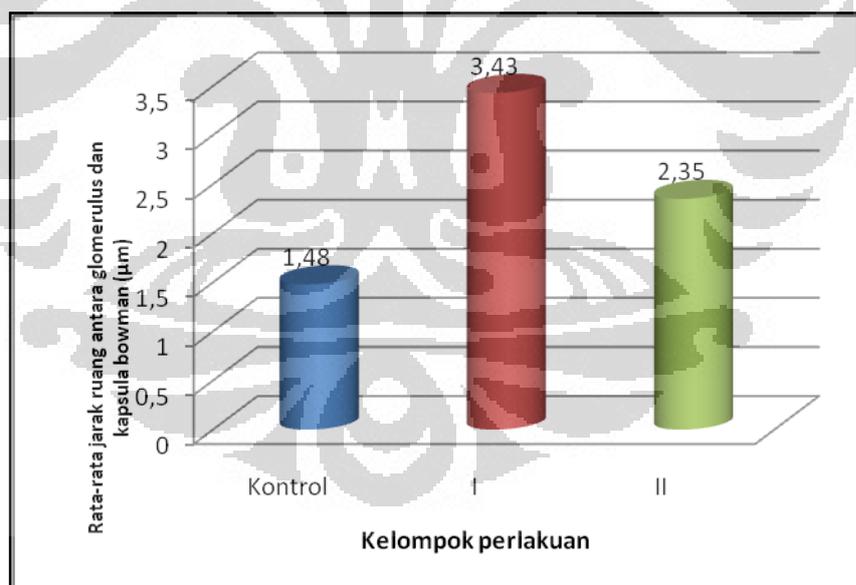
Keterangan: A = glomerulus yang mengalami pengerutan, B = ruang antara glomerulus dan kapsula bowmann, C= degenerasi tubulus kontortus distal, D= degenerasi tubulus kontortus proksimal.

Gambar 4.25. Gambaran histologis kompleks jukstaglomerulus ginjal mencit dosis 2150 mg/kg bb dengan perbesaran 400x pada pengamatan 14 hari



Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Gambar 4.26 Diagram batang rata-rata diameter glomerulus ginjal mencit tiap perlakuan



Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Gambar 4.27 Diagram batang rata-rata jarak ruang antara glomerulus dan kapsula bowmann ginjal mencit tiap perlakuan



TABEL

Tabel 4.8. Hasil berat badan dan persen bobot basah hati dan ginjal terhadap bobot badan mencit tiap kelompok perlakuan pada 7 hari pengamatan.

Kelompok Perlakuan	Berat Badan Awal Mencit (gram)	Berat Badan Akhir Mencit (gram)	Berat Basah Hati terhadap bobot tubuh (gram)	Berat Basah Ginjal terhadap bobot tubuh (gram)
	23,44	25,40	5,82	1,57
	24,36	26,40	5,90	1,36
	27,12	28,92	5,87	1,51
	26,02	25,92	5,63	1,77
	25,27	26,18	5,99	1,33
	24,37	25,43	5,89	1,14
	26,61	25,37	5,55	1,37
	25,44	25,81	5,46	1,31
	23,07	25,14	5,52	1,67
	25,52	25,47	5,65	1,37
	22,81	24,75	5,85	1,41
	23,29	25,67	6,07	1,55
	25,63	28,13	5,79	1,45
	25,57	26,56	5,68	1,20
Kontrol normal	24,21	25,95	5,89	1,65
	22,69	24,84	5,71	1,12
	25,02	26,83	5,85	1,22
	23,65	22,94	5,84	1,43
	23,12	25,68	5,64	1,40
	22,29	24,56	5,41	1,42
	22,96	24,13	5,38	1,24
	22,41	24,83	5,43	1,20
	22,17	24,61	5,52	1,09
	25,12	26,39	5,87	1,17
	22,38	25,40	5,98	1,41
	23,93	25,00	5,56	1,20
	22,12	22,62	5,92	1,45
	22,08	23,52	6,16	1,19
	23,05	24,40	5,65	1,47
	23,00	25,02	5,87	1,27
Rata-rata ± SD	23,95 ± 1,45 (gram)	25,39 ± 1,30 (gram)	5,75 ± 0,20 (%)	1,37 ± 0,17 (%)

Kelompok Perlakuan	Berat Badan Awal Mencit (gram)	Berat Badan Akhir Mencit (gram)	Berat Basah Hati terhadap bobot tubuh (gram)	Berat Basah Ginjal terhadap bobot tubuh (gram)
	22,57	18,50	7,18	2,05
	25,50	20,52	7,01	1,99
	24,79	20,91	7,12	2,00
	24,70	21,31	7,08	2,06
	23,79	20,16	7,24	1,83
	24,46	20,10	7,26	2,33
	23,46	21,43	7,04	1,77
	23,93	19,30	7,46	2,22
	23,88	18,67	7,28	2,03
	23,70	20,74	7,13	2,16
	24,34	20,48	7,08	1,90
	26,03	18,18	7,09	1,92
	23,38	19,56	7,25	1,99
	24,06	25,01	7,11	2,07
	24,14	24,14	7,33	2,11
	21,81	15,24	7,21	2,36
	23,21	19,06	7,24	1,99
	22,17	18,20	7,25	1,86
	23,54	18,68	7,38	2,35
	23,96	18,46	7,25	1,73
	24,03	18,37	7,13	1,79
Dosis I	23,74	20,83	7,15	2,59
	23,42	24,34	7,31	2,42
	23,68	20,49	7,22	1,61
	23,47	20,97	7,53	1,90
	22,73	19,27	7,26	2,02
	23,68	18,26	7,00	1,86
	21,73	17,70	7,28	2,03
	21,98	18,38	7,29	1,68
	22,56	20,64	7,31	1,93
	21,26	21,98	7,09	2,00
	22,86	16,17	7,29	1,79
	22,55	18,54	7,28	1,83
	21,76	18,56	7,48	1,72
	22,37	20,98	7,05	1,85
	22,52	18,58	7,10	1,77
	22,25	18,58	7,31	1,66
	22,68	20,28	7,39	1,87
	22,41	19,42	7,05	2,11
	22,28	20,52	7,01	1,70
	21,92	17,45	7,22	1,54
	22,40	18,59	7,15	1,88
	22,63	19,15	7,31	1,98
	22,42	18,23	7,35	1,97
	23,30	19,37	7,22	1,96
Rata-rata ± SD (gram)	23,20 ± 1,04	19,65 ± 1,89	7,22 ± 0,12	1,96 ± 0,21

Kelompok Perlakuan	Berat Badan Awal Mencit (gram)	Berat Badan Akhir Mencit (gram)	Berat Basah Hati terhadap bobot tubuh (gram)	Berat Basah Ginjal terhadap bobot tubuh (gram)
	26,53	26,64	6,19	1,76
	26,33	26,40	5,87	1,70
	25,87	26,18	5,84	1,79
	25,54	25,95	6,01	1,77
	24,80	25,79	6,04	1,62
	27,57	27,59	6,01	1,77
	26,76	26,84	6,14	1,71
	26,31	27,52	6,10	1,74
	25,07	25,79	6,20	1,70
	24,81	25,43	6,01	1,65
	25,51	25,86	6,03	1,66
	24,67	25,52	6,19	1,76
	24,38	24,86	6,15	1,64
	24,39	24,62	6,01	1,70
	24,07	24,51	6,24	1,67
	24,31	24,72	6,14	1,69
	24,10	24,64	6,08	1,70
	24,58	25,05	6,06	1,79
	24,66	24,79	6,05	1,65
	23,40	23,55	5,94	1,61
	23,57	24,06	5,94	1,62
	22,00	22,32	6,13	1,61
	22,03	22,59	6,06	1,68
Dosis II	21,84	22,31	6,14	1,70
	22,54	22,76	6,01	1,71
	22,81	22,95	6,10	1,74
	23,34	23,99	5,83	1,70
	22,82	23,33	6,00	1,62
	23,30	23,93	5,93	1,62
	22,42	22,99	5,95	1,65
	22,02	22,20	6,03	1,62
	22,12	22,98	6,04	1,65
	21,38	21,98	6,00	1,68
	24,51	24,94	6,13	1,80
	23,33	23,44	6,22	1,70
	22,67	22,97	6,05	1,65
	21,11	21,94	6,10	1,64
	21,87	21,89	6,03	1,64
	21,16	21,58	6,07	1,66
	22,19	22,47	6,31	1,73
	22,42	22,65	6,18	1,72
	22,16	22,84	6,17	1,70
	24,17	24,94	6,29	1,72
	23,17	23,22	6,20	1,67
	23,33	23,88	6,11	1,67
Rata-rata ± SD (gram)	23,73 ± 1,62	24,16 ± 1,62	6,07 ± 0,10	1,69 ± 0,05

Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Tabel 4.9. Hasil pengukuran rata-rata diameter vena sentralis hati, derajat kerusakan hati, diameter glomerulus ginjal, dan rata-rata jarak ruang antara glomerulus dan kapsula bowman pada 7 hari pengamatan.

Kelompok	Rata-rata Diameter Vena Sentralis Hati (μm)	Derajat Kerusakan Hati	Rata-rata Glomerulus Ginjal (μm)	Rata-rata Jarak Ruang antara Glomerulus dan Kapsula Bowman (μm)
	29,44	ringan	32,84	1,44
	30,19	ringan	33,43	1,38
	28,62	ringan	33,92	1,68
	28,74	ringan	34,9	1,38
	29,35	ringan	32,94	1,64
	28,53	ringan	33,86	1,87
	28,15	ringan	31,03	1,46
	28,92	ringan	32,97	1,88
	29,67	ringan	33,17	1,18
	29,11	ringan	34,03	1,34
	29,02	ringan	31,24	1,68
	29,13	ringan	32,54	1,34
	28,20	ringan	30,54	1,98
Kontrol normal	29,63	ringan	31,93	1,41
	28,11	ringan	33,41	1,28
	28,59	ringan	33,52	1,03
	29,09	ringan	33,21	1,17
	28,69	ringan	32,83	1,81
	28,27	ringan	34,18	1,48
	28,98	ringan	34,61	1,38
	29,39	ringan	34,13	1,42
	28,43	ringan	30,53	1,54
	28,34	ringan	33,62	1,38
	28,12	ringan	30,85	1,41
	29,05	ringan	32,57	1,42
	29,86	ringan	34,2	1,03
	28,25	ringan	33,15	1,72
	29,00	ringan	34,82	1,34
	28,49	ringan	36,52	1,77
	28,09	ringan	34,55	1,72
Rata-rata \pm SD (μm)	28,84 \pm 0,56	-	33,20 \pm 1,39	1,48 \pm 0,24

Kelompok	Rata-rata Diameter Vena Sentralis Hati (μm)	Derajat Kerusakan Hati	Rata-rata Glomerulus Ginjal (μm)	Rata-rata Jarak Ruang antara Glomerulus dan Kapsula Bowman (μm)
	40,56	sedang	25,03	3,38
	41,15	sedang	22,35	3,36
	41,15	sedang	24,59	3,14
	40,55	sedang	23,51	3,33
	41,64	sedang	24,07	3,31
	40,39	sedang	26,68	3,21
	42,32	sedang	24,5	3,46
	41,39	sedang	25,05	3,52
	42,28	sedang	23,82	3,59
	40,98	sedang	23,82	3,37
	42,72	sedang	24,88	3,38
	42,21	sedang	24,16	3,66
	41,98	sedang	23,81	3,28
	40,86	sedang	25,01	3,39
	40,99	sedang	23,46	3,4
	42,23	sedang	22,88	3,22
	41,42	sedang	24,61	3,36
	42,54	sedang	24,57	3,38
	41,39	sedang	23,96	3,33
	42,15	sedang	23,57	3,26
	41,55	sedang	24,16	3,39
Dosis I	42,01	sedang	24,78	3,23
	42,17	sedang	23,16	3,46
	41,51	sedang	23,72	3,65
	41,67	sedang	23,21	3,35
	40,48	sedang	25,03	3,64
	42,75	sedang	24,16	3,26
	40,86	sedang	24,13	3,78
	42,81	sedang	22,68	3,46
	42,28	sedang	24,51	3,49
	42,19	sedang	22,61	3,53
	43,15	sedang	23,18	3,88
	41,43	sedang	24,05	3,45
	43,30	sedang	22,12	3,38
	40,44	sedang	23,19	3,44
	42,39	sedang	22,51	3,67
	42,61	sedang	23,43	3,53
	42,89	sedang	22,49	3,46
	40,01	sedang	23,32	3,42
	41,57	sedang	24,94	3,61
	43,23	sedang	23,27	3,33
	43,81	sedang	22,47	3,46
	42,32	sedang	24,35	3,38
	43,67	sedang	22,69	3,6
	40,64	sedang	22,59	3,44
Rata-rata \pm SD (μm)	41,83 \pm 0,94	-	23,80 \pm 0,95	3,43 \pm 0,15

Kelompok	Rata-rata Diameter Vena Sentralis Hati (μm)	Derajat Kerusakan Hati	Rata-rata Glomerulus Ginjal (μm)	Rata-rata Jarak Ruang antara Glomerulus dan Kapsula Bowman (μm)
	33,19	berat	29,80	2,18
	34,62	berat	28,22	2,28
	35,74	berat	30,77	1,98
	34,35	berat	30,56	2,10
	33,55	berat	30,12	2,14
	34,15	berat	29,64	2,12
	33,92	berat	32,06	2,89
	35,67	berat	29,75	2,14
	35,11	berat	29,81	2,12
	33,02	berat	28,81	2,10
	33,13	berat	29,51	2,41
	34,39	berat	30,02	2,32
	37,31	berat	29,66	2,24
	34,59	berat	28,40	2,10
	33,67	berat	30,34	2,76
	35,24	berat	28,75	2,98
	34,92	berat	30,22	2,57
	33,18	berat	29,07	2,12
	33,88	berat	30,36	2,65
	32,89	berat	31,75	2,24
	32,39	berat	31,94	2,34
	33,04	berat	28,57	2,28
	33,18	berat	32,65	2,32
Dosis II	35,55	berat	30,25	2,60
	32,41	berat	28,74	2,89
	32,71	berat	31,55	2,87
	34,48	berat	31,19	2,22
	32,66	berat	28,19	2,28
	34,05	berat	30,80	2,10
	33,85	berat	28,95	2,12
	32,83	berat	31,56	2,12
	34,47	berat	31,33	2,24
	33,92	berat	31,99	2,56
	34,36	berat	29,64	2,38
	33,32	berat	28,59	2,64
	32,64	berat	31,55	2,22
	34,34	berat	32,11	2,34
	32,47	berat	29,55	2,56
	34,34	berat	29,05	2,28
	32,94	berat	31,05	2,48
	33,17	berat	29,72	2,76
	34,21	berat	32,74	2,38
	33,51	berat	30,18	2,12
	33,28	berat	29,93	2,34
	33,36	berat	30,42	2,15
Rata-rata \pm SD (μm)	33,86 \pm 1,04	-	30,21 \pm 1,23	2,35 \pm 0,25

Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Tabel 4.10. Hasil berat badan dan persen bobot basah hati dan ginjal terhadap bobot badan mencit tiap kelompok perlakuan pada 14 hari pengamatan.

Kelompok Perlakuan	Berat Badan Awal Mencit (gram)	Berat Badan Akhir Mencit (gram)	Berat Basah Hati terhadap bobot tubuh (gram)	Berat Basah Ginjal terhadap bobot tubuh (gram)
Kontrol normal	25,06	26,26	5,88	1,54
	24,46	25,72	5,90	1,56
	25,31	26,14	5,87	1,51
	26,22	27,51	5,73	1,67
	25,14	26,38	5,78	1,56
	24,62	26,08	5,76	1,44
Rata-rata ± SD (gram)	25,13 ± 0,62	26,35 ± 0,61	5,82 ± 0,07	1,55 ± 0,07
Dosis I	25,44	22,05	6,98	2,05
	25,36	23,00	7,02	1,87
	25,12	22,98	6,89	1,96
	24,08	24,16	7,24	2,21
	24,13	23,98	7,33	1,68
	24,88	23,88	7,08	1,73
	26,61	24,61	6,96	2,16
	26,56	25,11	7,14	2,00
	26,14	24,34	7,02	1,88
Rata-rata ± SD (gram)	25,37 ± 0,94	23,79 ± 0,95	7,07 ± 0,14	1,95 ± 0,18
Dosis II	26,00	26,01	6,16	1,66
	26,18	26,21	6,22	1,72
	26,26	26,30	6,06	1,78
	25,88	25,91	5,09	1,81
	25,69	25,70	5,78	1,68
	25,34	25,58	5,92	1,72
	24,48	24,60	6,36	1,69
	24,93	25,00	6,44	1,51
	24,16	24,20	6,68	1,77
Rata-rata ± SD (gram)	25,43 ± 0,76	25,50 ± 0,74	6,08 ± 0,46	1,70 ± 0,08

Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Tabel 4.11. Hasil pengukuran rata-rata diameter vena sentralis hati, derajat kerusakan hati, diameter glomerulus ginjal, dan rata-rata jarak ruang antara glomerulus dan kapsula bowman pada 14 hari pengamatan.

Kelompok	Rata-rata Diameter Vena Sentralis Hati (μm)	Derajat Kerusakan Hati	Rata-rata Glomerulus Ginjal (μm)	Rata-rata Jarak Ruang antara Glomerulus dan Kapsula Bowman (μm)
Kontrol normal	28,20	ringan	32,88	1,47
	28,16	ringan	33,06	1,32
	27,98	ringan	33,12	1,61
	28,62	ringan	31,88	1,57
	28,27	ringan	32,47	1,43
	28,39	ringan	32,68	1,24
Rata-rata \pm SD (μm)	28,27 \pm 0,22	-	32,68 \pm 0,46	1,44 \pm 0,14
Dosis I	33,21	sedang	30,01	3,01
	33,06	sedang	29,98	3,00
	33,14	sedang	30,11	2,98
	33,26	sedang	28,98	3,16
	32,98	sedang	30,06	3,22
	33,16	sedang	30,12	3,12
	32,87	sedang	30,11	3,08
	32,96	sedang	29,16	3,01
Rata-rata \pm SD (gram)	33,16 \pm 0,26	-	29,72 \pm 0,51	3,07 \pm 0,08
Dosis II	30,21	berat	30,44	2,66
	30,14	berat	31,22	2,48
	30,36	berat	31,31	2,36
	31,31	berat	30,96	2,35
	30,68	berat	30,67	2,31
	31,97	berat	31,24	2,44
	32,88	berat	30,00	2,51
	30,01	berat	30,04	2,48
	30,00	berat	30,12	2,63
Rata-rata \pm SD (gram)	30,84 \pm 1,01	-	30,67 \pm 0,54	2,46 \pm 0,12

Keterangan: Kontrol normal: akuades; Dosis I: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 840 mg/kg bb; Dosis II: tembaga (II) sulfat pentahidrat dosis 2150 mg/kg bb.

Tabel 4.12. Hasil akurasi dan presisi nilai LD₅₀ tembaga (II) sulfat pentahidrat menggunakan metode OECD 425 “Up-and-Down Procedure”

Tanggal	LD50 literatur (mencit)	1	2 (duplo)	3 (triplo)
18/03/12	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb
27/03/12	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb
04/04/12	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb
14/04/12	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb
23/04/12	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb	1344 mg/kg bb



LAMPIRAN

Lampiran 1. Kriteria penghentian uji toksisitas akut oral OECD 425

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

▲ Stop setelah hewan #6 karena 3 hewan hidup pada batas 5000 mg/kg (#4-#6)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Step	(I)include; (E)xclude	Dose	(X)response (O)non-resp.	Included in nominal <i>n</i>	log10 Dose	LD50 =	#DIV/0!	LD50 =	#DIV/0!	LD50 =	#DIV/0!
			OK			Prob. of response	likelihoood contribn. (In <i>L</i>)	Prob. of response	likelihoood contribn. (In <i>L</i>)	Prob. of response	likelihoood contribn. (In <i>L</i>)
1	I	175	O	no	2.2430	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	I	550	O	no	2.7404	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	I	1750	O	no	3.2430	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	I	5000	O	no	3.6990	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
5	I	5000	O	no	3.6990	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
6	I	5000	O	no	3.6990	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
7	E				-						
8	E				-						
9	E				-						
10	E				-						
11	E				-						
12	E				-						
13	E				-						
14	E				-						
15	E				-						
Nominal Sample size =				0							
Actual number tested =				6							
Calculated maximum likelihood estimate of LD50 =				none							

Abaikan semua kotak perhitungan. Tidak ada pengulangan dalam kolom yang dituju

Perhitungan *Maximum Likelihood* tidak dapat dilakukan. LD50 lebih dari 5000 mg/kg

The screenshot shows the AOT425StatPgm software interface. The main window displays the following information:

- Test / Substance:** Example of Stopping Criterion in Paragraph (i)(3)(iii)(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	
7			Stop Dosing		
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

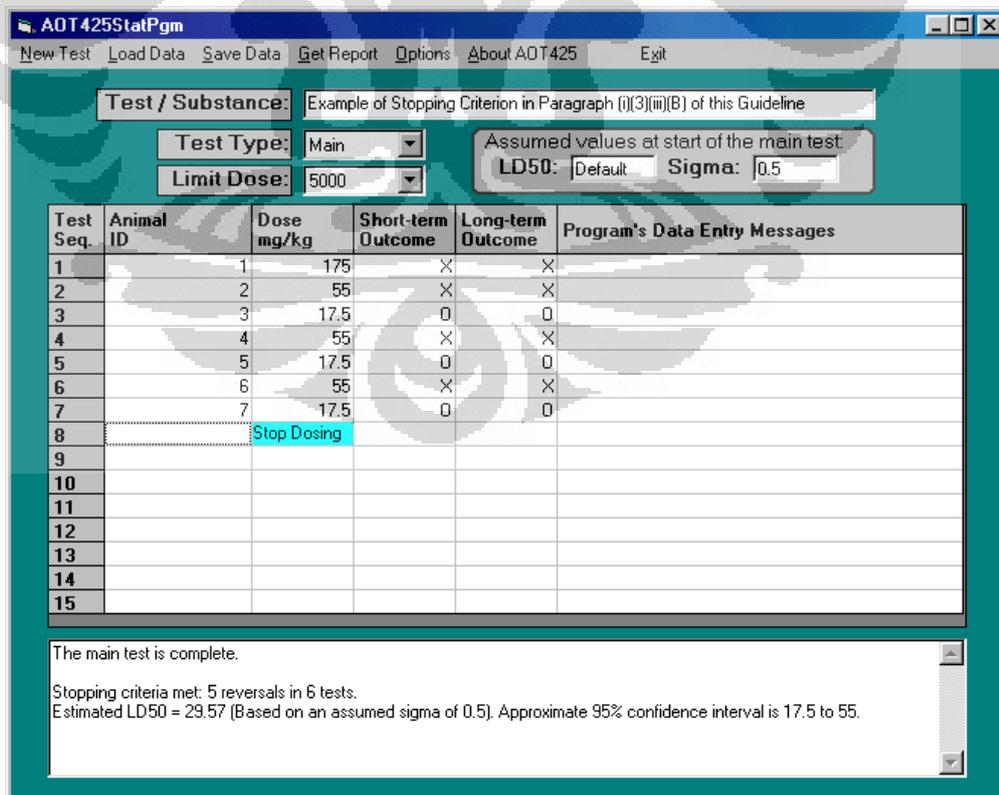
The main test is complete.
Stopping criteria met: 3 at Limit Dose.
The LD50 is greater than 5000 mg/kg.

[Sumber: OECD, 2001a, telah diolah kembali]

- b. Lima pengulangan muncul pada 6 hewan yang diujikan. Dimulai dari dosis terendah saat ditemukan hewan uji yang hidup, setelah itu dilakukan uji pada konsentrasi diatas dosis terendah tersebut dan uji pada kedua konsentrasi ini dilakukan sebanyak 2x (*vice versa*);

▲ Stop setelah hewan #7 karena 5 pengulangan muncul dalam 6 hewan yang diuji (#2-#7)

1 Step	2 (I)include; (E)xclude	3 Dose	4 (X)response (O)non-resp.	5 Included in nominal n	6 log10 Dose	7		8		9		10		11		12		
						LD50 = 31.0	Prob. of response	likelihood contribn. (ln LI)	LD50 = 12.4	Prob. of response	likelihood contribn. (ln LI)	LD50 = 77.6	Prob. of response	likelihood contribn. (ln LI)				
1	I	175	X	no	2.2430	0.9335	-0.0688	0.9892	-0.0108	0.7602	-0.2742							
2	I	55	X	yes	1.7404	0.6905	-0.3703	0.9020	-0.1031	0.3826	-0.9607							
3	I	17.5	O	yes	1.2430	0.3095	-0.3703	0.6174	-0.9607	0.0980	-0.1031							
4	I	55	X	yes	1.7404	0.6905	-0.3703	0.9020	-0.1031	0.3826	-0.9607							
5	I	17.5	O	yes	1.2430	0.3095	-0.3703	0.6174	-0.9607	0.0980	-0.1031							
6	I	55	X	yes	1.7404	0.6905	-0.3703	0.9020	-0.1031	0.3826	-0.9607							
7	I	17.5	O	yes	1.2430	0.3095	-0.3703	0.6174	-0.9607	0.0980	-0.1031							
8	E				-	-	-	-	-	-	-							
9	E				-	-	-	-	-	-	-							
10	E				-	-	-	-	-	-	-							
11	E				-	-	-	-	-	-	-							
12	E				-	-	-	-	-	-	-							
13	E				-	-	-	-	-	-	-							
14	E				-	-	-	-	-	-	-							
15	E				-	-	-	-	-	-	-							
Nominal Sample size =					6													
Actual number tested =					7													
Dose-averaging estimator					31.02													
log10 =					1.492													
log-likelihood sums:						-2.2906		-3.2021		-3.4655								
likelihoods:						0.1012		0.0407		0.0313								
likelihood ratios:								2.4880		3.2378								
Individual ratios exceed critical value?					critical=	2.5	Perhitungan otomatis tidak relevan dalam kasus ini		FALSE		TRUE							
Both ratios exceed critical value?									FALSE		FALSE							
Calculated maximum likelihood estimate of LD50 =					29.6	Estimasi akhir muncul dari Kalkulasi Maximum Likelihood												



[Sumber: OECD, 2001a, telah diolah kembali]

- c. Penghentian dihentikan jika ditemukan 3x kematian pada 4 konsentrasi yang sama.

▲ Stop ketika kriteria LR tercapai, pada hewan uji #9.
Cek kriteria LR dimulai pada hean #6

Assumed slope	2	sigma =	0.5	Parameters of convergence criterion	
Result: The LR criterion is met				critical LR	2.5
				factor of LD50	2.5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Step	(I)include; (E)exclude	Dose	(X)response (O)non-resp.	included in nominal n	log10 Dose	Contrib.to DAE	LD50 = Prob. of response	1292.8 likelihood contribution. (ln Li)	LD50 = Prob. of response	517.1 likelihood contribution. (ln Li)	LD50 = Prob. of response	3232.0 likelihood contribution. (ln Li)
			OK									
1	I	175	O	no	2.2430	0.0000	0.0412	-0.0421	0.1733	-0.1903	0.0057	-0.0057
2	I	550	O	yes	2.7404	2.7404	0.2289	-0.2600	0.5214	-0.7368	0.0620	-0.0640
3	I	1750	X	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.5046	0.8552	-0.1564	0.2971	-1.2138
4	I	550	O	yes	2.7404	2.7404	0.2289	-0.2600	0.5214	-0.7368	0.0620	-0.0640
5	I	1750	X	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.5046	0.8552	-0.1564	0.2971	-1.2138
6	I	550	O	yes	2.7404	2.7404	0.2289	-0.2600	0.5214	-0.7368	0.0620	-0.0640
7	I	1750	O	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.9257	0.8552	-1.9323	0.2971	-0.3525
8	I	5000	X	yes	3.6990	3.6990	0.8800	-0.1279	0.9756	-0.0247	0.6477	-0.4344
9	I	1750	X	yes	3.2430	3.2430	0.6037	-0.5046	0.8552	-0.1564	0.2971	-1.2138
10	E					0.0000						
11	E					0.0000						
12	E					0.0000						
13	E					0.0000						
14	E					0.0000						
15	E					0.0000						

Nominal Sample size =	8
Actual number tested =	9
Dose-averaging estimator	1292.78
log10 =	3.112
log-likelihood sums:	
likelihoods:	-3.3894
likelihood ratios:	0.0337
Individual ratios exceed critical value?	critical= 2.5
Both ratios exceed critical value?	TRUE
Calculated maximum likelihood estimate of LD50 =	1329.6

Estimasi akhir muncul dari Kalkulasi Maximum Likelihood

ADT425StatPgm

New Test Load Data Save Data Get Report Options About ADT425 Exit

Test / Substance: Example of Stopping Criterion in Paragraph (j)(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.

[Sumber: OECD, 2001a, telah diolah kembali]

Lampiran 2. Tabel konversi perhitungan dosis (Laurence & Bacharach, 1964)

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmot 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2,0 kg	Kera 4,0 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
20 g Mencit	1,0	7,0	12,29	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200g	0,14	1,0	1,74	3,3	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,06	2,4	4,5	14,2
Kucing 2,0 Kg	0,03	0,23	0,42	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4,0 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Lampiran 3. Dosis konversi tembaga (II) sulfat pentahidrat

Menurut *Material Safety Data Sheet* Tembaga (II) Sulfat Pentahidrat, diketahui LD₅₀ akut oral adalah 960 mg/kg bb (tikus). Adapun konversi dosis pada tikus dengan berat 200 g ke mencit 20 g adalah 0,14 (Laurence & Bacharach, 1964).

Perhitungan dosis :

$$\text{LD}_{50} \text{ untuk tikus (200 g)} = 960 \text{ mg/kg bb} \times \frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} = 192 \text{ mg/200 g}$$

Konversi dosis tikus (200 g) ke mencit (20 g) = 192 mg/200 g x 0,14 = 26,88 mg/20 g atau 1344 mg/kg bb mencit.

Faktor pengalihan antar dosis yang ditetapkan oleh OECD 425 adalah 3,2. Sehingga jika nilai LD₅₀ sudah diketahui, maka untuk menghitung dosis pertama dan dosis kedua, cukup mengalikan dan membagi dengan 1,6 (faktor pengalihan 3,2 dibagi 2 = 1,6).

Dosis awal yang diberikan adalah setengah dosis (1,6 kali lebih rendah daripada nilai LD₅₀) yang tertera pada literatur (*Material Safety Data Sheet*) yaitu 840 mg/kg bb mencit atau 16,8 mg/20 g. Karena volume maksimal yang dapat diberikan pada mencit secara oral adalah 1,0 ml, maka konsentrasi tembaga (II) sulfat yang diberikan adalah 12% (120 mg/ml).

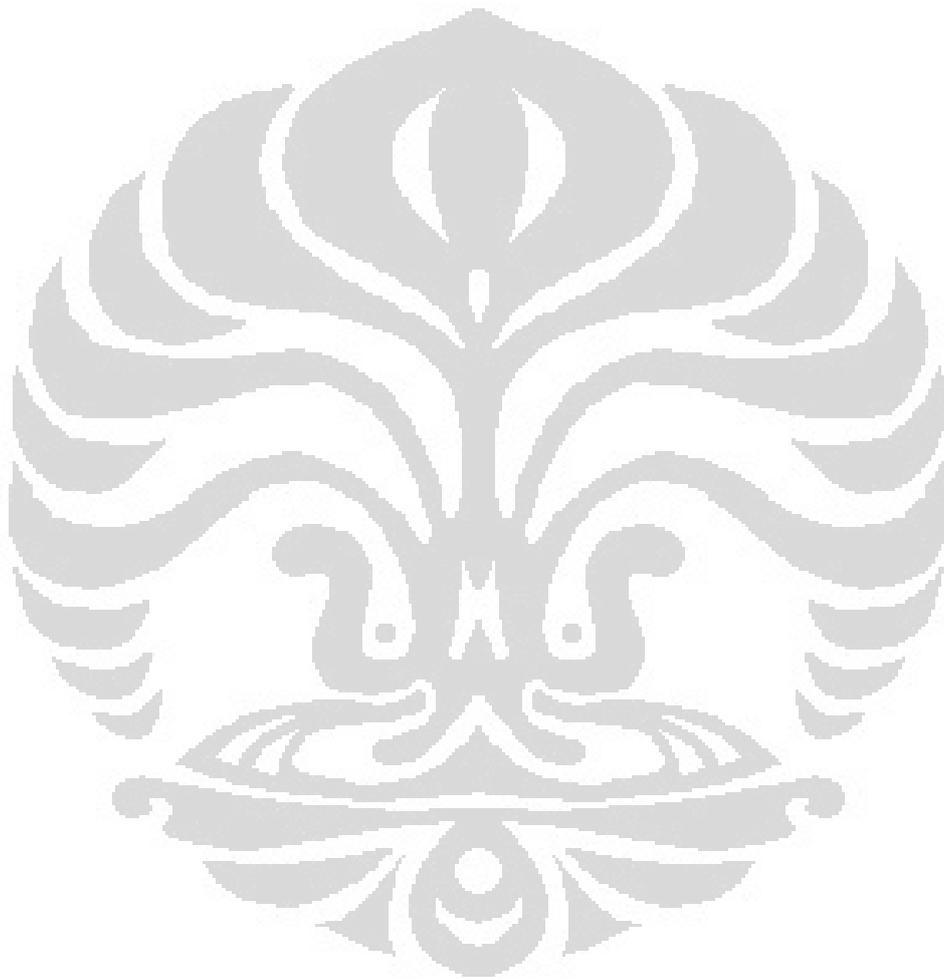
$$\text{Volume yang diberikan} = \frac{16,8 \text{ mg}}{120 \text{ mg/ml}} = 0,14 \text{ ml (untuk 20 gram mencit)}$$

Dosis kedua yang diberikan adalah setengah dosis (1,6 kali lebih tinggi daripada nilai LD₅₀) yang tertera pada literatur (*Material Safety Data Sheet*) yaitu 2150 mg/kg bb mencit atau 43 mg/20 g. Karena volume maksimal yang dapat diberikan pada mencit secara oral adalah 1,0 ml, maka konsentrasi tembaga (II) sulfat yang diberikan adalah 12% (120 mg/ml).

$$\text{Volume yang diberikan} = \frac{43 \text{ mg}}{120 \text{ mg/ml}} = 0,36 \text{ ml (untuk 20 gram mencit)}$$

Lampiran 4. Pembuatan larutan tembaga (II) sulfat pentahidrat

Serbuk standar tembaga (II) sulfat pentahidrat ditimbang sebanyak 12,0 g secara saksama kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml dan dilarutkan dengan akuades hingga larut lalu dicukupkan volumenya hingga batas.



Lampiran 5. Daftar pemeriksaan fisik dan pengamatan hewan dalam uji toksisitas akut metode OECD 425 (OECD, 2001a)

- | | |
|-------------------------------|------------------------------|
| 1. Perubahan Kulit dan Bulu | 8. Respon somatik |
| 2. Mata dan Membran mukosa | • Mencakar |
| 3. Aktivitas motorik | • Menggeliat |
| • Aktivitas motorik menurun | 9. Kelemahan |
| • Aktivitas motorik meningkat | • Lesu |
| 4. Reaksi yang aneh | 10. Hilang kesadaran |
| • Berkeliling tanpa arah | 11. Tremor |
| • Menyeruduk | 12. Pernapasan |
| • Gerakan menyodok hidung | • Laju pernafasan naik |
| • Gerakan berputar-putar | • Laju pernafasan turun |
| 5. Ekor abnormal | • Kedalaman pernafasan naik |
| • Ekor kaku | • Kedalaman pernafasan turun |
| • Ekor lemas | • Pernapasan tidak teratur |
| 6. Konvulsi | 13. Tidak berefek |
| 7. Diare | 14. Kematian |
| 7. Lethargi | |

Keterangan:

Pengamatan pertama dilakukan secara individual sedikitnya 30 menit hingga 3 jam setelah pemberian. Kemudian pengamatan dilakukan berulang pada 24 jam kemudian sampai 7 hari kecuali jika hewannya mati maka pengamatan dihentikan.

Lampiran 6. Hasil pengujian toksisitas akut oral berdasarkan *software* AOT425StatPgm pada pengamatan 7 hari ulangan I

AOT425statpgm (Version: 1.0) Test Results and Recommendations
Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Program

Date/Time: Sunday, March 18, 2012, 10:11:07 AM
Data file name: DATA 1.dat
Last modified: 3/18/2012 10:11:09 AM

Test/Substance: copper (II) sulphate pentahydrate
Test type: Main Test
Limit dose (mg/kg): 5000
Assumed LD50 (mg/kg): Default
Assumed sigma (mg/kg): 0.5

Recommended dose progression: 5000, 1750, 550, 175, 55, 17.5, 5.5, 1.75

DATA:

Test Seq.	Animal ID	Dose (mg/kg)	Short-term Result	Long-term Result
1	1	840	O	O
2	2	2150	X	X
3	3	840	O	O
4	4	2150	X	X
5	5	840	O	O
6	6	2150	X	X

(X = Died, O = Survived)

Dose Recommendation: The main test is complete.

Stopping criteria met: 5 reversals in 6 tests. LR criterion.

SUMMARY OF LONG-TERM RESULTS:

Dose	O	X	Total
840	3	0	3
2150	0	3	3
All Doses	3	3	6

Statistical Estimate based on long term outcomes:

Estimated LD50 = 1344 (Based on an assumed sigma of 0.5).
Approximate 95% confidence interval is 840 to 2150.

Lampiran 7. Hasil pengujian toksisitas akut oral berdasarkan *software* AOT425StatPgm pada pengamatan 7 hari ulangan II

AOT425statpgm (Version: 1.0) Test Results and Recommendations
Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Program

Date/Time: Tuesday, March 27, 2012, 12:11:53 AM
Data file name: DATA 2.dat
Last modified: 3/27/2012 12:11:46 AM

Test/Substance: copper (II) sulphate pentahydrate
Test type: Main Test
Limit dose (mg/kg): 5000
Assumed LD50 (mg/kg): Default
Assumed sigma (mg/kg): 0.5

Recommended dose progression: 5000, 1750, 550, 175, 55, 17.5, 5.5, 1.75

DATA:

Test Seq.	Animal ID	Dose (mg/kg)	Short-term Result	Long-term Result
1	1	840	O	O
2	2	2150	X	X
3	3	840	O	O
4	4	2150	X	X
5	5	840	O	O
6	6	2150	X	X

(X = Died, O = Survived)

Dose Recommendation: The main test is complete.

Stopping criteria met: 5 reversals in 6 tests. LR criterion.

SUMMARY OF LONG-TERM RESULTS:

Dose	O	X	Total
840	3	0	3
2150	0	3	3
All Doses	3	3	6

Statistical Estimate based on long term outcomes:

Estimated LD50 = 1344 (Based on an assumed sigma of 0.5).
Approximate 95% confidence interval is 840 to 2150.

Lampiran 8. Hasil pengujian toksisitas akut oral berdasarkan *software* AOT425StatPgm pada pengamatan 7 hari ulangan III

AOT425statpgm (Version: 1.0) Test Results and Recommendations
Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Program

Date/Time: Thursday, April 05, 2012, 11:12:59 AM
Data file name: DATA 3.dat
Last modified: 4/5/2012 11:13:00 AM

Test/Substance: copper (II) sulphate pentahydrate
Test type: Main Test
Limit dose (mg/kg): 5000
Assumed LD50 (mg/kg): Default
Assumed sigma (mg/kg): 0.5

Recommended dose progression: 5000, 1750, 550, 175, 55, 17.5, 5.5, 1.75

DATA:

Test Seq.	Animal ID	Dose (mg/kg)	Short-term Result	Long-term Result
1	1	840	O	O
2	2	2150	X	X
3	3	840	O	O
4	4	2150	X	X
5	5	840	O	O
6	6	2150	X	X

(X = Died, O = Survived)

Dose Recommendation: The main test is complete.

Stopping criteria met: 5 reversals in 6 tests. LR criterion.

SUMMARY OF LONG-TERM RESULTS:

Dose	O	X	Total
840	3	0	3
2150	0	3	3
All Doses	3	3	6

Statistical Estimate based on long term outcomes:
Estimated LD50 = 1344 (Based on an assumed sigma of 0.5).
Approximate 95% confidence interval is 840 to 2150.

Lampiran 9. Hasil pengujian toksisitas akut oral berdasarkan *software* AOT425StatPgm pada pengamatan 7 hari ulangan IV

AOT425statpgm (Version: 1.0) Test Results and Recommendations
Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Program

Date/Time: Saturday, April 14, 2012, 10:21:26 AM
Data file name: DATA 4.dat
Last modified: 4/14/2012 10:23:26 AM

Test/Substance: copper (II) sulphate pentahydrate
Test type: Main Test
Limit dose (mg/kg): 5000
Assumed LD50 (mg/kg): Default
Assumed sigma (mg/kg): 0.5

Recommended dose progression: 5000, 1750, 550, 175, 55, 17.5, 5.5, 1.75

DATA:

Test Seq.	Animal ID	Dose (mg/kg)	Short-term Result	Long-term Result
1	1	840	O	O
2	2	2150	X	X
3	3	840	O	O
4	4	2150	X	X
5	5	840	O	O
6	6	2150	X	X

(X = Died, O = Survived)

Dose Recommendation: The main test is complete.

Stopping criteria met: 5 reversals in 6 tests. LR criterion.

SUMMARY OF LONG-TERM RESULTS:

Dose	O	X	Total
840	3	0	3
2150	0	3	3
All Doses	3	3	6

Statistical Estimate based on long term outcomes:

Estimated LD50 = 1344 (Based on an assumed sigma of 0.5).
Approximate 95% confidence interval is 840 to 2150.

Lampiran 10. Hasil pengujian toksisitas akut oral berdasarkan *software* AOT425StatPgm pada pengamatan 7 hari ulangan V

AOT425statpgm (Version: 1.0) Test Results and Recommendations
Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Program

Date/Time: Wednesday, April 25, 2012, 10:15:54 AM
Data file name: DATA 5.dat
Last modified: 4/25/2012 10:18:50 AM

Test/Substance: copper (II) sulphate pentahydrate
Test type: Main Test
Limit dose (mg/kg): 5000
Assumed LD50 (mg/kg): Default
Assumed sigma (mg/kg): 0.5

Recommended dose progression: 5000, 1750, 550, 175, 55, 17.5, 5.5, 1.75

DATA:

Test Seq.	Animal ID	Dose (mg/kg)	Short-term Result	Long-term Result
1	1	840	O	O
2	2	2150	X	X
3	3	840	O	O
4	4	2150	X	X
5	5	840	O	O
6	6	2150	X	X

(X = Died, O = Survived)

Dose Recommendation: The main test is complete.

Stopping criteria met: 5 reversals in 6 tests. LR criterion.

SUMMARY OF LONG-TERM RESULTS:

Dose	O	X	Total
840	3	0	3
2150	0	3	3
All Doses	3	3	6

Statistical Estimate based on long term outcomes:
Estimated LD50 = 1344 (Based on an assumed sigma of 0.5).
Approximate 95% confidence interval is 840 to 2150.

Lampiran 11. Hasil pengujian toksisitas akut oral berdasarkan *software* AOT425StatPgm pada pengamatan 14 hari

AOT425statpgm (Version: 1.0) Test Results and Recommendations
Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Program

Date/Time: Wednesday, April 25, 2012, 14:00:54 AM
Data file name: DATA 6.dat
Last modified: 4/25/2012 14:10:40 AM

Test/Substance: copper (II) sulphate pentahydrate
Test type: Main Test
Limit dose (mg/kg): 5000
Assumed LD50 (mg/kg): Default
Assumed sigma (mg/kg): 0.5

Recommended dose progression: 5000, 1750, 550, 175, 55, 17.5, 5.5, 1.75

DATA:

Test Seq.	Animal ID	Dose (mg/kg)	Short-term Result	Long-term Result
1	1	840	O	O
2	2	2150	X	X
3	3	840	O	O
4	4	2150	X	X
5	5	840	O	O
6	6	2150	X	X

(X = Died, O = Survived)

Dose Recommendation: The main test is complete.

Stopping criteria met: 5 reversals in 6 tests. LR criterion.

SUMMARY OF LONG-TERM RESULTS:

Dose	O	X	Total
840	3	0	3
2150	0	3	3
All Doses	3	3	6

Statistical Estimate based on long term outcomes:

Estimated LD50 = 1344 (Based on an assumed sigma of 0.5).
Approximate 95% confidence interval is 840 to 2150.

Lampiran 12. *Log book* suhu dan kelembapan ruangan ketika uji toksisitas akut metode OECD 425

Tanggal	Suhu (°C)	Kelembapan ruangan (%)
10/03/2012	27	63
11/03/2012	27	64
12/03/2012	28	62
13/03/2012	27	64
14/03/2012	27	65
15/03/2012	27	63
16/03/2012	27	63
17/03/2012	27	63
18/03/2012	26	63
19/03/2012	27	70
20/03/2012	27	63
21/03/2012	27	61
22/03/2012	27	63
23/03/2012	27	64
24/03/2012	26	64
25/03/2012	26	63
26/03/2012	27	64
27/03/2012	27	63
28/03/2012	27	64
29/03/2012	27	64
30/03/2012	27	63
31/03/2012	27	61
01/04/2012	28	63
02/04/2012	28	62
03/04/2012	27	65
04/04/2012	27	63
05/04/2012	27	63
06/04/2012	27	63
07/04/2012	27	64
08/04/2012	27	63
09/04/2012	27	63
10/04/2012	27	66
11/04/2012	27	64
12/04/2012	26	63
13/04/2012	27	64
14/04/2012	27	64
15/04/2012	27	64
16/04/2012	26	63
17/04/2012	27	63
18/04/2012	27	64
19/04/2012	27	64
20/04/2012	27	63
21/04/2012	27	63
22/04/2012	27	62
23/04/2012	26	63
24/04/2012	26	62
25/04/2012	27	63

**Lampiran 13. Surat Izin melakukan penelitian di laboratorium toksikologi
Pusarpedal-KLH**



**KEMENTERIAN LINGKUNGAN HIDUP
REPUBLIK INDONESIA**

Pusarpedal, Kawasan Puspipstek Serpong, Gedung 210, Serpong - Tangerang
Telp. : 021-7563114, 7563331, Fax. : 021-7563115, 75872028, Website : <http://www.menlh.go.id>

Serpong, 05 Januari 2012

Nomor : B- 01 / PS.VII/LH/ 01/2012
Lamp : -
Perihal : Permohonan izin penelitian

Kepada Yth.
Sekretaris Departemen Farmasi
Universitas Indonesia (UI)
Kampus UI Depok

Sehubungan dengan surat Saudara bernomor : 1492/H2.F3.12/PDP.04.01/2012 tertanggal 3 Januari 2012 perihal Permohonan Izin Penelitian dengan ini disampaikan bahwa kami dapat menerima penelitian pada instansi kami di Laboratorium Toksikologi PUSARPEDAL yang akan dilaksanakan pada bulan Februari - Mei 2012 atas nama:

NO	NAMA SISWA	NIM	PROG KEAHLIAN
1	Sri Rahayu Widya Ningrum	0806328114	Farmasi

Dalam pelaksanaan penelitian pada kantor PUSARPEDAL ada beberapa hal yang harus diperhatikan adalah sebagai berikut:

1. Mentaati peraturan yang berlaku di Pusarpedal
2. Pusarpedal tidak menyediakan transportasi, uang saku maupun penginapan.
3. Menyerahkan laporan setelah selesai melakukan Bimbingan Skripsi kepada Pusarpedal

Demikian kami sampaikan, atas perhatian kerjasamanya diucapkan terima kasih.



Pusat Sarana Pengendalian
Dinas Lingkungan-Dep. VII-KLH

Ir. Hari Wahyudi
NIP. : 19531223 198512 1 001

Tembusan Yth.
- Deputi VII - J.LH (sebagai laporan)

Lampiran 14. Surat izin melakukan penelitian di laboratorium patologi
BBPMSOH

KEMENTERIAN PERTANIAN
DIREKTORAT JENDERAL PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN
BALAI BESAR PENGUJIAN MUTU DAN SERTIFIKASI OBAT HEWAN GUNUNGSINDUR

JALAN RAYA PEMBANGUNAN GUNUNGSINDUR, BOGOR
TELEPON (021) 7560466, 7560489 FAKSIMILI (021) 7560466
E-mail : info@bbpmsoh.info Website : www.bbpmsoh.info

Nomor : 835 /SR.140/F5.I/04/2012 11 April 2012
Sifat : Biasa
Lampiran : -
Hal : Izin Analisis Histopatologi

Yth. Wakil Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Indonesia
di
Depok

Sehubungan dengan surat Saudara No. 110/H2.F15.D1/PDP.04.01.Skripsi/2012 tanggal 20 Maret 2012 perihal Permohonan Izin Analisis Histopatologi, Bersama ini diinformasikan bahwa pada prinsipnya tidak berkeberatan untuk menerima mahasiswa Saudara untuk melakukan Analisis Histopatologi di BBPMSOH. Sehubungan dengan hal tersebut, agar segera dikirimkan rencana kerja/proposal untuk kegiatan yang bersangkutan.

Demikian kami sampaikan, Atas perhatiannya diucapkan terima kasih.

Kepala Balai Besar,

Drh. Enuh Rahardjo Djusa, Ph.D.
NIP. 19590513 198603 1 013

Lampiran 15. Sertifikat analisis tembaga (II) sulfat pentahidrat dari Wako Pure Chemical Industries,Ltd.

CERTIFICATE OF ANALYSIS : 030-04425 1/1 ページ



Wako Pure Chemical Industries,Ltd.

1-2,Doshomachi 3-Chome,Chuo-Ku,Osaka 540-8605,Japan

Certificate of Analysis

Product Number : 030-04425
 Chemical Name : Copper(II) Sulfate Pentahydrate
 Grade : Wako 1st Grade
 Lot Number : JWN7346
 Unit : 500g

TEST	SPECIFICATION	RESULT
Appearance	Blue, Crystals - Crystalline powder	Passed
Solubility in water	to pass test (clear-nearly clear)	Clear
Chloride (Cl)	max. 0.003%	Passed
Nitrogen compounds(as N)	max. 0.004%	Passed
Iron(Fe)	max. 0.007%	Passed
Assay	min. 99.0%	100.0%
Date of QC-Release		Apr. 8, 2011

M. Nanaura
 Mitsuo Nanaura General Manager
 Q.A. Department

Date of issue : May 24, 2012
 Issuing Number : 7846643

This is an electronically generated document

https://www.e-reagent.com/cgi-bin/gx.cgi/AppLogic+ufg280kisi_pr.ufg280kisi_sikenD... 24/5/2012

Lampiran 16. Sertifikat hewan uji



**BAGIAN PRODUKSI TERNAK DAGING KERJA DAN ANEKA TERNAK
DEPARTEMEN ILMU PRODUKSI DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

Sekretariat : Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680
Telepon : (0251) 8624774, Fax. (0251) 8624774

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dr. Ir. Asnath M Fuah, MS
Jabatan : Kepala Bagian Produksi Ternak Daging Kerja dan Aneka Ternak
Alamat : Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga-Bogor
Telp. 0251-8624774, Fax. 0251-8624774

Menyatakan bahwa mencit (*Mus musculus*) strain DDY yang dikembangkan di Laboratorium Aneka Ternak, Fakultas Peternakan IPB, Telah memenuhi syarat sebagai hewan uji untuk penelitian atau kegiatan praktikum.

Demikian surat keterangan ini dibuat dengan sebenar-benarnya.

Kepala Bagian
Produksi Ternak Daging, Kerja dan Aneka Ternak



Dr. Ir. Asnath M. Fuah, MS
NIP. 195410151979032001

Lampiran 17. Cara pengukuran diameter vena sentralis dan Glomerulus

Misalkan kedua gambar diatas adalah dua bentuk (elips dan lingkaran) penampang vena sentralis dan glomerulus yang terlihat pada mikroprojektor. Diameter vena sentralis dan glomerulus diukur dengan cara menjumlahkan panjang garis a (vertikal) dan panjang garis b (horizontal), kemudian jumlah tersebut dibagi 2 (Widiastuti, 1998).

$$d = \frac{a + b}{2}$$