



METODE ANALISIS EKOTOKSIKOLOGI PERAIRAN

PENGUJIAN SENYAWA TOKSIN

- Toksisitas semua bahan tergantung pada konsentrasinya
- Contohnya Selenium : merupakan komponen penting pada pakan hewan, namun dalam konsentrasi yang tinggi mungkin dapat memiliki efek toksik.
- Faktor lingkungan lain yang harus diperhatikan:
 - tingkat biodegradasi zat
 - tingkat akumulasi zat
 - waktu retensi zat
- Istilah yang digunakan u/ menjelaskan efek zat beracun pada suatu organisme adalah
 - Lethal : menyebabkan kematian langsung
 - Sub lethal : tidak cukup menyebabkan kematian (pengaruh lain)
 - Akut : menyebabkan efek (kemungkinan kematian) dalam waktu singkat
 - Kronis : menyebabkan efek (lethal/subletal) dalam periode yang lama
 - Akumulatif : efek yg ditingkatkan dengan dosis berturut2

- Untuk menguji efek toksisitas, dapat digunakan tes LD50 / LC50 (Dosis mematikan)
- LD50 adalah dosis yang cukup besar untuk membunuh 50% dari sampel hewan yang diuji
- LC50 adalah konsentrasi yang cukup besar untuk membunuh 50% dari sampel hewan yang diuji
- Apa beda LD50 dan LC 50 ?



Toksisitas beberapa senyawa terhadap organisme

LD50 (mg/kg berat badan)	Senyawa toksin	Klasifikasi toksin
1-10	Arsenik	Tinggi
10-100	Kadmium Tembaga Air Raksa	Menengah
100-1000	Alumunium Molibdenum Seng	Ringan

Kriteria Toksik Komisi Pestisida (Departemen Pertanian)

Kriteria toksik	LC50 (mg/L)
Sangat toksik	< 1
Tinggi	1-10
Sedang	10-100
Rendah	> 100



LC50 (ppb) Pestisida pada organisme akuatik

Pestisida		Larva nyamuk (LC50, 24 jam)	12 ekan (LC50, 96 jam)
Organoklorin	DDT	70	2-21
	Heptaklor	5,4	-
	Endrin	15	-
	Toksafen	-	-
	Aldrin	-	-
	Dieldrin	7,9	2-131
	Tiodan	-	3-18
	BHC	27	-
Organofosfat	Abate	1,6	-
	Bayteks	4,2	980-3404
	Klontinon	25	-
	Diazinon	83	-
	Dibrom	-	-
	Dkorvos	75	-

- Efek toksik suatu zat dalam air dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan lain seperti suhu, oksigen terlarut, kandungan unsur kimia makro/mikro, dan pH.
- Contoh ;
 1. Logam berat seperti tembaga, perak, timah, emas, nikel, kromium, seng, kadmium, dan merkuri umumnya menjadi kurang toksik pada perairan yang kaya kalsium.
 2. Kompleksitas nikel-sianida adalah 500 kali lebih beracun bagi ikan pada pH 7 daripada pH 8 karena kompleks tersebut berdisosiasi menjadi sianida dan ion nikel dan proporsi sianida membentuk hidrogen sianida (HCN) yang sangat beracun.
 3. Amonia 10 kali lebih beracun pada pH 8 daripada pH 7.



TOKSIK AKUT

- Toksisitas akut menjelaskan efek samping yang dihasilkan dari paparan tunggal terhadap suatu zat.
- Pengujian toksisitas akut tidak etis jika dilakukan terhadap manusia, oleh karena itu, dilakukan pengujian terhadap hewan uji.
- Toksisitas akut berbeda dari toksisitas kronis yang menggambarkan efek buruk dari paparan berulang, sering pada tingkat yang lebih rendah, ke suatu zat selama periode waktu yang lebih lama (bulan ke tahun)
- Letalitas akut (paparan singkat), sementara letalitas kronis (paparan yang lebih lama).
- Tes toksisitas akut dan kronis dirancang untuk menilai efek jangka pendek dan jangka panjang.



TOKSIK KRONIK

- Toksisitas kronik adalah kemampuan zat yang memiliki efek toksik pada organisme hidup, ketika organisme tersebut terpapar zat secara terus menerus atau berulang-ulang.
- Titik akhir toksisitas kronis jarang didasarkan pada kematian, tetapi lebih pada perubahan fisiologis, perilaku atau biokimia yang halus yang disebabkan paparan organisme ke dalam suatu zat toksik.
- Contoh :
 - 1. Jika seseorang melakukan radium finest, sebagian besar akan diserap ke dalam tulang dan akan memberikan efek berbahaya pada kesehatan seseorang. Radium dapat menyebabkan gangguan pada bagian pembentukan sel darah.



PENGUJIAN BIOINDIKATOR

- Pemilihan bioindikator perlu dihasilkan untuk menggambarkan kondisi dan mewakili keadaan dari pencemaran yang terjadi di lapangan.
- Kriteria pemilihan bioindikator :
 1. Sensitif terhadap lingkungan
 2. Respon cepat (tingkat trofik rendah, siklus hidup pendek)
 3. Melimpah / ekonomis rendah / mudah penanganannya
 4. Mudah untuk diamati (morfologi, jaringan, protein, ...)
 5. Relevansi dengan titik akhir (perbedaan hasil respon yang rendah diantara individu lain)



ORGANISME BIOINDIKATOR

○ Invertebrata laut

Rotifera, Copepods, Krustasea, Kerang

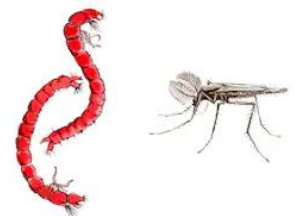


○ Invertebrata air tawar

Krustasea (*Daphnia*, *Hyalella*, *Palaemonetes*)



Larva insekta (*Pteronarcys*, *Hexagenia*, *Brachycentrus*, *Chironomus*)



ORGANISME BIOINDIKATOR

- Spesies ikan yang digunakan untuk uji toksisitas

1. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) :
pemaparan akut 7 hari, subkronis 250 hari,
kronis > 250 hari
2. Ikan zebra (*Brachydanania rerio*) : pemaparan
akut 4 hari, subkronis 30 hari, kronis > 30 hari.
3. Ikan kecil fathead (*Pimephales promelas*):
pemaparan akut 7 hari, subkronis 50 hari,
kronis > 30 hari.



PENGUJIAN BIOINDIKATOR

- Pendekatan model hewan uji monospesies di tingkat laboratorium. Memperkirakan resiko senyawa baru atau menilai kualitas lingkungan.
- Pendekatan model hewan uji multispesies di tingkat laboratorium.

Ada 2 jenis utama :

1. Studi eksperimental dalam kondisi luar ruangan untuk meniru sifat struktural dan fungsi ekosistem. Menjembatani kesenjangan antara eksperimen laboratorium dan lapangan.
2. Berbasis laboratorium bertujuan untuk menghasilkan model ekotoksikologis yang lebih kompleks dan representatif. Multispesies, dan faktor abiotik.



UJI IN VITRO

Suatu uji yang dilaksanakan di luar tubuh hewan uji

Uji toksisitas *in vitro* adalah suatu uji untuk enentukan tingkat ketoksikan suatu bahan yang di uji menggunakan media biakan bahan biologi tertentu yang merupakan subjek dari pengujian (respon molekul atau sel spesifik)

Contoh :

1. uji obat antiinfeksi (antibiotik) menggunakan kultur media bakteri penyebab penyakit (sitotoksisitas)
2. obat antivirus menggunakan kultur jaringan untuk perkembangbiakan virus tertentu,
3. obat antikanker menggunakan kultur jaringan sel kanker (sel myeloma) atau sel normal (fibrobalas)
4. anthelmintik (obat cacing) menggunakan kultur/media cacing dapat tumbuh dan berkembang, demikian pula terhadap obat antijamur.



- Informasi yang diperoleh dari hasil uji toksisitas *in vitro* adalah mengetahui besarnya konsentrasi bahan uji yang dapat membunuh 50% (lethal concentration 50% = LC50) dari bahan biologi yang dikultur/dibenhikan.
- Toksisitas *in vitro* cenderung terjadi pada dosis yang jauh lebih rendah daripada efek *in vivo*, tetapi dapat berarti juga bahwa suatu zat dapat bersifat toksik *in vitro* tetapi tidak *in vivo*.
- Tes *in vitro* umumnya jangka pendek (< 1 minggu) yang memberikan pengukuran secara cepat.
- Sedangkan untuk mengetahui keamanan bahan uji yang telah lolos melalui uji toksisitas *in vitro*, masih dilakukan tahapan uji toksisitas *in vivo* sebelum pelaksanaan uji lebih lanjut.



Batasan penting pada pengujian in vitro:

- Tidak ada penggabungan toksikokinetik
Toksikokinetik termasuk penyerapan, distribusi, metabolisme dan ekskresi (ADME), yang dapat mempengaruhi toksisitas suatu zat. Pengaruh kerja organ-organ tertentu seperti lambung, hati, ginjal.
- Sensitivitas lebih tinggi tapi relevansi lebih rendah
Mengukur efek suatu bahan kimia terhadap biomolekul. Pada seluruh organisme, mekanisme pertahanan dan detoksifikasi dapat mengatasi sejumlah efek tanpa keonsekuensi kesehatan yang signifikan.



UJI IN VIVO

- Suatu uji yang dilaksanakan di dalam tubuh hewan uji
- Uji toksisitas *in vivo* adalah suatu uji toksisitas yang dilakukan pada hewan coba, dengan tujuan untuk menentukan tingkat ketoksikan suatu zat/bahan terhadap perubahan fungsi fisiologis maupun perubahan yang bersifat patologis pada organ vital dalam kurun waktu tertentu.
- Uji toksisitas *in vivo* meliputi uji toksisitas umum dan uji toksisitas khusus.
- Berdasarkan lama waktu terjadinya efek toksik maka uji toksisitas umum dibagi atas tiga bagian yakni uji toksisitas akut, uji toksisitas subkronis dan uji toksisitas kronis.
- Sedangkan uji toksisitas khusus meliputi uji teratogenik, uji karsinogenik dan uji mutagenik. (dipersyaratkan hanya untuk obat-obat yang akan di distribusikan untuk negara Eropa dan Amerika Serikat)

Kelemahan pengujian in vivo

- Ekstrapolasi spesies antar spesies

Semakin besar perbedaan spesies uji dengan manusia ekstrapolasi semakin renggang

- Sensitivitas

Efek in vivo terdeteksi pada konsentrasi $\mu\text{g/L}$. Jika tujuan penelitian hanya untuk mendeteksi racun, perlu metode lain yang lebih sensitif

- Faktor lingkungan sebagai pembias

Paramter fisika kimia seperti suhu, pH, kekeruhan, warna dan zat lain dapat menyebabkan toksisitas buatan pada organisme uji.

- Kebutuhan pemahaman kode etik

- Biaya



MEKANISME UJI TOKSISITAS AKUT

1. Uji penentuan selang konsentrasi.
Konsentrasi bahan uji ditentukan peningkatannya berdasarkan pada deret logaritmik.

Misal : 0,01 – 0,1 – 1 – 10 – 100 ppm

Hasil akhir untuk menentukan nilai

- ambang bawah : konsentrasi tertinggi dimana semua hewan uji tetap hidup dalam selang waktu 48 jam
- ambang atas : konsentrasi terendah dimana semua hewan uji matai dalam selang waktu 24 jam.



2. Uji Utama : untuk menentukan LC50 selama 96 jam. Minimal 5 perlakuan konsentrasi + 1 perlakuan kontrol. Ulangan minimal 2 kali.

$$\text{Log}\left(\frac{N}{n}\right) = k \text{Log}\left(\frac{a}{n}\right)$$

Keterangan:

N : Konsentrasi ambang atas

n : Konsentrasi ambang bawah

a : Konsentrasi terkecil dalam deret konsentrasi yang ditentukan

k : Jumlah konsentrasi yang di uji

Selanjutnya dilakukan analisis terhadap hasil yang diperoleh dari persamaan di atas untuk mendapatkan konsentrasi toksikan yang akan diujikan pada uji toksisitas akut. Adapun persamaan yang digunakan untuk mendapatkan konsentrasi-konsentrasi tersebut yaitu:

$$a/n = b/a = c/b = d/c = e/d$$

Keterangan:

n : Konsentrasi ambang bawah

a : Nilai konsentrasi terkecil dalam uji toksisitas akut

b, c, d, e : Nilai konsentrasi yang diujikan pada uji toksisitas akut





Gambar 2.2 Contoh bagan alir prosedur kerja uji toksisitas akut (Zulfahmi 2014)

Untuk menentukan LC₅₀-96, maka dilakukan analisis probit.
Lihat video pada V-class

MEKANISME UJI TOKSISITAS SUB KRONIK

- Untuk mengetahui pengaruh toksik terhadap tingkat gangguan fisiologis dan kerusakan jaringan terhadap organisme uji.
- Konsentrasi toksikan pada uji-subkronik didasarkan pada konsentrasi batas aman toksikan, dan nilai interval naik dari konsentrasi batas aman.
- Selama uji media diaerasi dan hewan uji diberi pakan.
- Lama pemeliharaan tergantung spesies uji dan parameter yang ingin diperoleh.
- Dampak paparan toksikan dapat dianalisis mulai dari tingkat sel hingga organ. Karena keterbatasan maka sering sulit diwujudkan.



- Efek polutan dapat dibagi menjadi : efek terhadap pertumbuhan, pernapasan, pencernaan, reproduksi, dan hematologi.
- Parameter pertumbuhan yang sering diukur : kelangsungan hidup dan laju pertumbuhan bobot rata-rata harian (LPBRH).
- Dampak terhadap pernapasan, pencernaan, dan reproduksi dapat diamati melalui perubahan morfologi organ maupun perubahan struktur jaringan-pada organ-organ target.





TERIMA KASIH