

Nanoteknologi — Karakteristik suspensi kerja objek nano pada uji *in vitro* dalam mengevaluasi toksisitas objek nano inheren

Nanotechnologies — Characteristics of working suspensions of nano-objects for in vitro assays to evaluate inherent nano-object toxicity

(ISO 19337-2:2023, IDT)

Pengguna dari RSNI ini diminta untuk menginformasikan adanya hak paten dalam dokumen ini, bila diketahui, serta memberikan informasi pendukung lainnya (pemilik paten, bagian yang terkena paten, alamat pemberi paten dan lain-lain)

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata.....	ii
Pendahuluan.....	iii
1 Ruang lingkup.....	2
2 Acuan normatif	2
3 Istilah dan definisi.....	2
4 Istilah yang disingkat.....	4
5 Karakteristik dan metode pengukuran	4
5.1 Umum	4
5.2 Stabilitas suspensi kerja.....	6
5.3 Konsentrasi ion logam.....	8
5.4 Konsentrasi komponen media kultur.....	8
5.5 Kontaminasi.....	10
6 Pelaporan	10
6.1 Umum	10
6.2 Nama objek nano dan informasi manufaktur.....	10
6.3 Komposisi dan unsur logam yang disertakan dalam sampel objek nano	10
6.4 Media kultur dan serum.....	10
6.5 Hasil pengukuran	10
6.6 Metode opsional	12
Lampiran A (normatif) Alur pengukuran.....	14
Gambar A.1 — Alur pengukuran.....	14
Lampiran B (informatif) Pengukuran dan evaluasi stabilitas	16
Lampiran C (informatif) Pengukuran ion logam	18
Lampiran D (informatif) Pengukuran komponen media kultur	22
Lampiran E (informatif) Kontaminasi.....	24
Bibliografi	26
Gambar A.1 — Alur pengukuran	14

Prakata

SNI ISO 19337:2023, dengan judul *Nanoteknologi — Karakteristik suspensi kerja objek nano pada uji in vitro dalam mengevaluasi toksisitas objek nano inheren*, merupakan standar revisi dari SNI ISO/TS 19337:2016, *Nanoteknologi – Karakteristik dari suspensi kerja objek nano dalam uji in-vitro untuk mengevaluasi toksisitas objek nano inheren*. Standar ini disusun dengan jalur adopsi tingkat keselarasan identik dari ISO 19337:2023, *Nanotechnologies — Characteristics of working suspensions of nano-objects for in vitro assays to evaluate inherent nano-object toxicity*, dengan metode adopsi terjemahan dua bahasa dan ditetapkan oleh BSN tahun 202X.

Standar ini menggantikan SNI ISO/TS 19337:2016, *Nanoteknologi – Karakteristik dari suspensi kerja objek nano dalam uji in-vitro untuk mengevaluasi toksisitas objek nano inheren* yang disusun dengan metode adopsi terjemahan dua bahasa yang ditetapkan oleh BSN pada tahun 2022.

Dalam Standar ini, terdapat standar yang dijadikan sebagai acuan normatif dan telah diadopsi menjadi SNI, yaitu ISO/TS 80004-2:2010, *Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects*, yang telah diadopsi dengan tingkat keselarasan identik dua bahasa menjadi SNI ISO/TS 80004-2-2016, *Nanoteknologi – Kosakata – Bagian 2: Objek nano*.

Sebagai informasi ISO/TS 80004-2:2010 telah diabolisi dan digantikan oleh ISO 80004-1:2023, yang juga diadopsi dengan tingkat keselarasan identik dua bahasa menjadi SNI ISO 80004-1:2023, *Nanoteknologi — Kosakata — Bagian 1: Kosakata utama*.

Dalam Standar ini istilah “*this document*” pada standar ISO 19337:2023 yang diadopsi diganti dengan “*this Standard*” dan diterjemahkan menjadi “Standar ini”.

Penggunaan singkatan nama organisasi dan/atau istilah asing dalam Standar ini tetap dituliskan sesuai istilah dalam bahasa Inggrisnya untuk kemudahan penerapan.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 07-03, Nanoteknologi. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 24 Septemeber 2024 di Depok yang dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholder*) terkait, yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen, dan pakar. Standar ini telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal sampai dengan , dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

Apabila pengguna menemukan keraguan dalam Standar ini, maka disarankan untuk melihat standar aslinya yaitu ISO 19337:2023, dan/atau dokumen terkait lain yang menyertainya. Bagi pengguna Standar ini disarankan untuk memperhatikan referensi/acuan termutakhir pada acuan normatif untuk ketertelusuran informasi terbaru.

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari Standar ini dapat berupa hak kekayaan intelektual (HAKI). Namun selama proses perumusan SNI, Badan Standardisasi Nasional telah memperhatikan penyelesaian terhadap kemungkinan adanya HAKI terkait substansi SNI. Apabila setelah penetapan SNI masih terdapat permasalahan terkait HAKI, Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab mengenai bukti, validitas, dan ruang lingkup dari HAKI tersebut.

Pendahuluan

Sebelum objek nano memasuki pasar, kemungkinan dampaknya terhadap kesehatan manusia dan lingkungan sebaiknya dievaluasi secara cermat.

Uji toksisitas *in vitro* menggunakan sel yang dikultur sering digunakan sebagai alat dalam menyeleksi bahan untuk mengetahui kemungkinan sifat berbahayanya. Pengujian ini memberikan informasi penting untuk memahami mekanisme efek biologis yang disebabkan oleh material. Namun, objek nano memerlukan pertimbangan khusus sehubungan dengan uji toksisitas *in vitro*, karena perilaku uniknya dalam media kultur sel. Misalnya, segera setelah sampel objek nano dimasukkan ke dalam media kultur, objek nano dapat mengalami perubahan dalam

- a) pelarutan ion,
- b) formasi korona, atau
- c) agregasi/aglomerasi

menyebabkan perubahan ukuran partikel dan sedimentasi. Oleh karena itu, penting untuk mempertimbangkan fenomena yang disebutkan di atas dalam mengklarifikasi apakah efek yang diamati terkait dengan objek nano yang diuji itu sendiri atau dari sumber yang tidak terkontrol serta untuk menghindari salah penafsiran terhadap hasil pengujian. Misalnya, pembentukan korona, pelepasan ion logam dari objek nano dan pengotor (sisa dari proses sintesis objek nano) dapat mengganggu beberapa pengujian *in vitro*¹⁾, sehingga memberikan hasil yang tidak akurat. Selain itu, pembentukan aglomerat dan agregat dapat mengubah toksisitas suatu suspensi. Penting untuk menilai dan mendeskripsikan secara cermat karakteristik suspensi objek nano yang diuji.

Oleh karena itu, karakterisasi yang ketat dari suspensi kerja sebelum dan selama uji toksisitas *in vitro* terhadap karakteristik ini sangat penting untuk mengecualikan artefak percobaan *in vitro*. Dalam Standar ini, karakteristik penting terkait ketiga fenomena tersebut dan metode pengukuran yang dapat diterapkan dirangkum. Di sisi lain, Standar ini tidak mencakup strategi untuk memilih teknik yang cocok dari metode pengukuran yang berlaku karena suspensi kerja yang mengandung sampel objek nano untuk pengujian toksisitas *in vitro* memiliki komponen material, konsentrasi dan ukuran yang berbeda; dengan demikian, pemilihan yang cocok tergantung pada peneliti. Meskipun lampiran informatif terkait dan daftar referensi dalam Bibliografi disertakan dalam Standar ini untuk membantu pemilihan metode yang cocok oleh peneliti untuk memberikan kelonggaran dalam pemilihan metode karakterisasi, metode pilihan juga diberikan dalam Standar ini. Pada Pasal 6 dijelaskan rincian metode/prosedur karakterisasi; oleh karena itu, kecocokan karakterisasi dapat dinilai.

Tujuan dari Standar ini adalah agar hasil pengujian yang dapat diandalkan mengenai toksisitas objek nano dapat dibagikan dan dikomunikasikan di antara pemangku kepentingan objek nano, seperti regulator, masyarakat umum, pamanufaktur, dan pengguna akhir.

Introduction

Before nano-objects enter onto the market, their possible impact on human health and the environment should be carefully evaluated.

In vitro toxicity assays using cultured cells are frequently used as a tool in screening materials for possible hazardous properties. The testing provides essential information for understanding the mechanisms of biological effects induced by the materials. However, nano-objects require specific considerations with respect to the in vitro toxicity assays, because of their unique behaviour in cell culture medium. For example, immediately after the introduction of nano-object samples into the culture medium, the nano-objects can undergo changes in

- a) ionic dissolution,
- b) corona formation, or
- c) aggregation/agglomeration

leading to alteration in particles size and sedimentation. Therefore, it is critical to consider the above-mentioned phenomena in clarifying if the observed effects are related to the tested nano-object itself or from uncontrolled sources and to avoid false interpretation of assay results. For example, the corona formation, metal ion release from the nano-objects and impurities (residual from the nano-object synthesis process) can interfere with some in vitro assays^[1], producing inaccurate results. Additionally, the formation of agglomerates and aggregates can alter the toxicity of a suspension. It is important to carefully assess and describe the characteristics of the suspension of nano-objects being tested.

Therefore, the rigorous characterization of the working suspension prior and during in vitro toxicity assays on these characteristics is essential to exclude the in vitro experimental artefacts. In this Standard, the essential characteristics related to these three phenomena and applicable measurement methods were summarized. On the other hands, this Standard does not include a strategy to select the appropriate techniques from the applicable measurement methods because the working suspensions that contain nano-object samples for in vitro toxicity assays has the different materials components, concentration and sizes; thus, the appropriate selection is depending on the investigators. While the related informative annexes and the list of references in the Bibliography are included in this Standard to assist with appropriate method selection by investigators to make allowance for the characterization method selection, optional methods are also given in this Standard. In Clause 6, the details of the characterization methods/procedures are described; therefore, the appropriateness of the characterization can be judged.

The intention of this Standard is for reliable test results on nano-object toxicity to be shared and communicated among stakeholders of nano-objects, such as regulators, general public, manufacturers and end users.

Halaman ini sengaja dikosongkan untuk memastikan bahwa penyajian SNI dengan metode dua bahasa dapat menampilkan bahasa Indonesia pada halaman genap dan bahasa Inggris pada halaman ganjil.

Nanoteknologi — Karakteristik suspensi kerja objek nano pada uji *in vitro* dalam mengevaluasi toksisitas objek nano inheren

1 Ruang lingkup

Standar ini menjelaskan karakteristik suspensi kerja objek nano yang harus dipertimbangkan ketika melakukan pengujian *in vitro* untuk mengevaluasi toksisitas objek nano inheren. Selain itu, standar tersebut mengidentifikasi metode pengukuran yang dapat diterapkan untuk karakteristik ini.

Standar ini berlaku untuk objek nano, serta agregat dan aglomeratnya yang lebih besar dari 100 nm

Standar ini bertujuan untuk membantu memperjelas efek toksik yang diamati berasal dari objek nano yang diuji atau dari sumber yang tidak terkendali.

2 Acuan normatif

Dokumen acuan berikut sangat diperlukan untuk penerapan Standar ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang disebutkan yang berlaku. Untuk acuan tidak bertanggal, berlaku edisi terakhir dari dokumen acuan tersebut (termasuk seluruh perubahan/amendemennya).

ISO/TS 80004-2, *Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects*

3 Istilah dan definisi

Untuk tujuan Standar ini, istilah dan definisi yang ada dalam ISO/TS 80004-2 serta istilah dan definisi berikut ini berlaku.

ISO dan IEC memelihara basis data terminologi untuk digunakan dalam standardisasi pada alamat berikut:

- Platform penjelajahan daring ISO: tersedia di <http://www.iso.org/obp>
- IEC Elektropedia: tersedia di <http://www.electropedia.org/>

3.1

media kultur

larutan nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel

3.2

partikel sekunder

aglomerat/agregat partikel primer, protein dan komponen media lainnya

3.3

stabilitas

sifat-sifatnya tetap tidak berubah selama waktu tertentu di bawah kondisi penyimpanan dan penggunaan yang dinyatakan atau diharapkan secara wajar untuk uji toksisitas *in vitro*

Nanotechnologies — Characteristics of working suspensions of nano-objects for in vitro assays to evaluate inherent nano-object toxicity

1 Scope

This Standard describes the characteristics of working suspensions of nano-objects to be considered when conducting in vitro assays to evaluate inherent nano-object toxicity. In addition, the Standard identifies applicable measurement methods for these characteristics.

This Standard is applicable to nano-objects, and their aggregates and agglomerates greater than 100 nm.

This Standard intends to help clarify whether observed toxic effects come from tested nano-objects themselves or from uncontrolled sources.

2 Normative references

The following documents are referred to in the text in such a way that some or all of their content constitutes requirements of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/TS 80004-2, *Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects*

3 Terms and definitions

For the purposes of this Standard, the terms and definitions given in ISO/TS 80004-2 and the following apply.

ISO and IEC maintain terminology databases for use in standardization at the following addresses:

- ISO Online browsing platform: available at <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: available at <https://www.electropedia.org/>

3.1

culture medium

aqueous solution of nutrients required for cell growth

3.2

secondary particle

agglomerate/aggregate of primary particle(s), proteins and other medium components

3.3

stability

properties to remain unchanged over a given time under stated or reasonably expected conditions of storage and use for an in vitro toxicity assay

3.4

suspensi kerja

suspensi disiapkan untuk pengujian *in vitro* yang mencakup *media kultur* (3.1) dan sampel objek nano

3.5

kontaminasi

sejumlah kecil zat ekstrinsik yang ada dalam sampel objek nano yang memengaruhi pertumbuhan sel

4 Istilah yang disingkat

AAS	spektrometri absorpsi atomik
BCA	asam bicinchoninate
BSA	albumin serum sapi
C-U/F	ultrafiltrasi dengan bantuan sentrifugasi
DLS	hamburan cahaya dinamis
AF4	fraksinasi medan-aliran aliran-asimetris
ICP-AES	spektrometri emisi atomik plasma terkopel secara induktif
ICP-MS	spektrometri massa plasma terkopel secara induktif
LAL	lisat amebosit limulus
LD	difraksi laser
LPS	liposakarida
MAT	uji aktivasi monosit
PCR	reaksi rantai polimerase
ppt	bagian per triliun
SLS	hamburan cahaya statis
TFF	filtrasi aliran tangensial
TOC	total karbon organik
U/F	ultrafiltrasi
UV-Vis	ultraviolet-tampak

5 Karakteristik dan metode pengukuran

5.1 Umum

Untuk mengkarakterisasi suspensi kerja untuk pengujian toksisitas *in vitro*, perlu mengidentifikasi karakteristik tertentu yang dapat memengaruhi sistem biologis yang diuji. Suspensi kerja untuk dosis individu harus dibagi menjadi dua sampel, satu untuk uji toksisitas dan satu lagi untuk pengukuran karakteristik. Pasal 5 menentukan karakteristik penting dari suspensi kerja, yang tercantum di bawah ini, dan metode pengukuran yang dapat diterapkan pada suspensi kerja tersebut:

— stabilitas suspensi kerja;

3.4**working suspension**

suspension prepared for an in vitro assay that includes *culture medium* (3.1) and nano-object sample

3.5**contamination**

trace amounts of extrinsic substances present in the nano-object samples that affect cellular growth

4 Abbreviated terms

AAS	atomic absorption spectrometry
BCA	bicinchoninate acid
BSA	Bovine serum albumin
C-U/F	ultrafiltration assisted by centrifugation
DLS	dynamic light scattering
AF4	asymmetrical-flow field-flow fractionation
ICP-AES	inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry
LAL	limulus amoebocyte lysate
LD	laser diffraction
LPS	liposaccharides
MAT	monocyte activation test
PCR	polymerase chain reaction
ppt	parts per trillion
SLS	static light scattering
TFF	tangential flow filtration
TOC	total organic carbon
U/F	ultrafiltration
UV-Vis	ultraviolet-visible

5 Characteristics and measurement methods**5.1 General**

To characterize the working suspension for in vitro toxicity assays, it is necessary to identify certain characteristics that can impact the biological system tested. Working suspensions for individual dose shall be divided into two samples, one for toxicity assay and another for characteristics measurements. Clause 5 specifies essential characteristics of the working suspension, listed below, and measurement methods that are applicable to them:

- stability of working suspensions;

- konsentrasi ion logam;
- konsentrasi komponen media kultur;
- kontaminasi.

Pengukuran karakteristik tersebut harus dilakukan untuk setiap dosis suspensi kerja. Alur pengukuran harus sesuai dengan Lampiran A dan Gambar A.1.

5.2 Stabilitas suspensi kerja

5.2.1 Umum

Stabilitas suspensi kerja adalah karakteristik utama karena secara langsung berdampak pada kondisi pengujian *in vitro* dalam hal dosis objek nano ke sel^[2,3,4]. Agregasi/aglomerasi dan pengendapan gravitasi objek nano merupakan masalah utama yang dapat memengaruhi stabilitas benda nano yang tersuspensi. Stabilitas suspensi harus dievaluasi berdasarkan dua karakteristik, yaitu perubahan relatif ukuran partikel sekunder objek nano dan perubahan relatif konsentrasi objek nano dalam suspensi kerja. Perubahan ukuran partikel sekunder objek nano dapat disebabkan oleh aglomerasi partikel yang lebih kecil dalam media kultur. Perubahan relatif konsentrasi objek nano dapat dihasilkan dari pengendapan gravitasi selama uji toksisitas *in vitro* dengan mempertimbangkan durasi percobaan yang diperlukan untuk uji toksisitas *in vitro*. Hasil evaluasi stabilitas harus dinyatakan dalam satuan persen selama skala waktu untuk uji toksisitas *in vitro*.

ISO/TR 13097^[5] direkomendasikan sebagai panduan komprehensif untuk stabilitas suspensi kerja.

5.2.2 Perubahan ukuran representatif dari partikel sekunder objek nano

Metode yang cocok harus dipilih untuk mengukur secara langsung perubahan ukuran representatif dari partikel sekunder objek nano dari antara DLS^{[3],[6]}, LD^[7] dan SLS^[8]. Metode lain yang tidak tercantum dalam Standar ini dapat digunakan dan dilaporkan sesuai dengan metode pilihan dalam Pasal 6.6.

Lihat Lampiran B untuk pengukuran

5.2.3 Perubahan konsentrasi objek nano

Metode yang cocok harus dipilih untuk mengukur perubahan konsentrasi objek nano yang tersuspensi dalam media biologis dari hamburan cahaya statis^{[3],[6],[8]}, ICP-MS^{[9],[10],[11]}, absorpsi UV-Vis, transmisi sinar-X^[12] dan analisis karbon organik total^[13]. Metode lain yang tidak tercantum dalam Standar ini dapat digunakan dan dilaporkan sesuai dengan metode pilihan pada Pasal 6.6.

Lihat Lampiran B untuk pengukurannya.

- concentration of metal ions;
- concentration of culture medium components;
- contamination.

Measurements of those characteristics shall be made for each dose of working suspensions. The flow of measurements shall be in accordance with Annex A and Figure A.1.

5.2 Stability of working suspensions

5.2.1 General

Stability of working suspension is a key characteristic as it directly impacts the in vitro assay conditions in terms of the dose of the nano-objects to the cells^{[2],[3],[4]}. Aggregation/agglomeration and gravitational settling of the nano-objects are major issues that can affect the stability of the suspended nano-objects. The suspension stability shall be evaluated for the two characteristics, i.e. the relative change of representative size of secondary particles of nano-objects and the relative change of the concentration of nano-objects in the working suspension. The change in size of secondary particles of nano-objects can result from agglomeration of smaller particles in culture media. The relative change of nano-object concentration can result from gravitational settling during an in vitro toxicity assay by considering experimental duration required for the in vitro toxicity assay. Evaluation results of the stability shall be expressed in the unit of per cent over the timescale for an in vitro toxicity assay.

ISO/TR 13097^[5] is recommended as comprehensive guidance for stability of working suspension.

5.2.2 Representative size change of secondary particles of nano-objects

An appropriate method shall be selected to directly measure the representative size change of secondary particles of nano-objects from among DLS^{[3],[6]}, LD^[7] and SLS^[8]. Other methods not listed in this Standard can be used and reported according to the optional methods in 6.6. See Annex B for measurements.

5.2.3 Concentration change of nano-objects

An appropriate method shall be selected to measure the concentration change of nano-objects suspended in the biological media from among the static light scattering^{[3],[6],[8]}, ICP-MS^{[9],[10],[11]}, UV-Vis absorption, X-ray transmission^[12] and the total organic carbon analysis^[13]. Other methods not listed in this Standard can be used and reported according to the optional methods in 6.6.

See Annex B for measurements.

5.3 Konsentrasi ion logam

Ion logam yang dihasilkan dari pelarutan sampel uji objek nano, dapat berkontribusi terhadap toksisitas sel yang teramati. Konsentrasi ion logam dalam suspensi kerja harus diukur setelah pemisahan materi partikulat. Materi partikulat dapat dipisahkan dari fraksi ionik dengan U/F, C-U/F TFF atau sentrifugasi. Pengukuran harus dilakukan untuk semua unsur logam yang termasuk dalam sampel objek nano. Metode yang cocok harus dipilih untuk mengukur konsentrasi ion logam di antara ICP-AES, ICP-MS, AAS, dan metode kolorimetri. Harus diperhatikan bahwa banyak konstituen dalam media kultur seperti Na dan Cl dapat mengganggu analisis logam untuk beberapa teknik spektrometri, terutama ICP-MS^{[14]-[16]}. Metode lain yang tidak tercantum dalam Standar ini dapat digunakan dan dilaporkan sesuai dengan metode pilihan pada Pasal 6.6. Hasil pengukuran konsentrasi harus dinyatakan dalam satuan molaritas, massa/massa atau massa/volume. Pengukuran dapat dihilangkan ketika efek toksik tidak teramati pada sel dalam suspensi kerja. Lihat Lampiran A untuk contoh alur pengukuran.

Lihat Lampiran C untuk pengukurannya.

5.4 Konsentrasi komponen media kultur

5.4.1 Umum

Sampel objek nano yang ditambahkan ke media kultur untuk menghasilkan suspensi yang berfungsi dapat mengadsorpsi komponen media kultur^[1]. Adsorpsi ini dapat mengakibatkan stres kekurangan nutrisi pada sel uji. Konsentrasi komponen protein dan kalsium, sebagai pengganti komponen nutrisi dalam pelarut harus diukur setelah memberikan waktu yang cukup setelah penambahan sampel objek nano ke dalam media kultur. Jika komponen media kultur selain protein dan kalsium yang secara signifikan dapat memengaruhi stabilitas suspensi kerja untuk uji toksisitas *in vitro* diketahui, konsentrasi komponen tersebut juga harus diukur. Pengukuran dapat dihilangkan ketika efek toksik tidak teramati pada sel dalam suspensi kerja. Lihat Lampiran A untuk contoh alur pengukuran.

Sampel objek nano dalam media kultur harus diinkubasi dengan kondisi yang sama dengan uji *in vitro*. Objek nano dapat memengaruhi pH, osmolalitas, dan karakteristik penting lainnya dalam media kultur.

5.4.2 Protein

Metode yang cocok harus dipilih untuk pengukuran konsentrasi protein di antara metode BCA, Bradford, Lowry, dan ultraviolet, indeks bias, dan SLS yang digabungkan dengan AF4^{[17],[18]}. Ketika metode BCA^[19], Bradford^[20] atau Lowry^[21] dipilih, konsentrasi protein dalam pelarut harus diukur setelah pemisahan materi partikulat dari suspensi kerja. Hasil pengukuran konsentrasi protein harus dinyatakan dalam satuan massa/volume.

Lihat Lampiran D untuk pengukurannya

5.4.3 Kalsium

Metode pengukuran yang cocok harus dipilih untuk pengukuran konsentrasi kalsium dari ICP-AES, ICP-MS, AAS, dan metode kolorimetri. Hasil pengukuran konsentrasi kalsium harus dinyatakan dalam satuan molaritas, massa/massa, atau massa/volume.

Lihat Lampiran D untuk pengukurannya.

5.3 Concentration of metal ions

Metal ions, produced as a result of nano-object test sample dissolution, can contribute to observed cell toxicity. The concentration of metal ions in the working suspension shall be measured after separation of particulate matter. Particulate matter can be separated from the ionic fraction by U/F, C-U/F TFF or centrifugation. The measurement shall be made for all metallic elements that are included in the nano-object sample. An appropriate method shall be selected to measure the metal ion concentrations from among ICP-AES, ICP-MS, AAS and the colorimetric method. It shall be noted that many constituents in culture media such as Na and Cl can interfere with metals analysis for some spectrometry techniques, especially ICP-MS^{[14]-[16]}. Other methods not listed in this Standard can be used and reported according to the optional methods in 6.6. Measurement results of concentrations shall be expressed in the unit of molarity, mass/mass or mass/volume. The measurements can be omitted when a toxic effect is not observed to the cells in the working suspensions. See Annex A for an example of flow of measurements.

See Annex C for measurements.

5.4 Concentration of culture medium components

5.4.1 General

A nano-object sample added to a culture medium to generate a working suspension can adsorb components of the culture medium^[1]. This adsorption can result in starvation stress to the test cells. The concentration of protein components and calcium, as surrogates for the nutritional components in the solvent shall be measured after allowing enough time after the addition of nano-object sample to the culture medium. If culture medium components other than protein and calcium that can significantly affect the stability of the working suspension for in vitro toxicity assays are known, the concentration of those components shall be measured as well. The measurements can be omitted when a toxic effect is not observed to the cells in the working suspensions. See Annex A for an example of flow of measurements.

Nano-object sample in culture medium shall be incubated with the same conditions of in vitro test. Nano-objects can affect pH, osmolality and other essential characteristics in the culture medium.

5.4.2 Proteins

An appropriate method shall be chosen for the protein concentration measurement from among BCA, Bradford, Lowry, and ultraviolet, refractive index and SLS methods coupled with the AF4^{[17],[18]}. When BCA^[19], Bradford^[20] or Lowry^[21] method are chosen, the protein concentration in the solvent shall be measured after separation of particulate matter from the working suspension. Results of protein concentration measurement shall be expressed in the unit of mass/volume.

See Annex D for measurements.

5.4.3 Calcium

An appropriate measurement method shall be chosen for the calcium concentration measurement from among ICP-AES, ICP-MS, AAS and the colorimetric method. Results of calcium concentration measurement shall be expressed in the unit of molarity, mass/mass or mass/volume.

See Annex D for measurements.

5.5 Kontaminasi

Kontaminasi dapat menjadi sumber tindakan toksik tambahan. Endotoksin dan mikoplasma harus ditentukan dengan metode yang cocok.

Pengukuran endotoksin tersedia dengan uji LAL (lihat ISO 29701), uji LAL berbasis kromogenik^[22], MAT^[23], uji Faktor C rekombinan^[24], dan kromatografi cair berkinerja tinggi yang dipadukan dengan metode spektrometri massa^[25].

Kontaminasi mikoplasma adalah salah satu masalah utama dalam pengujian *in vitro*. Mikoplasma dapat dideteksi dengan metode berbasis PCR^[26], metode kultur^[27] dan metode mikroskop fluoresens^[28].

Sampel objek nano harus diperlakukan secara aseptik. Harus dipastikan bahwa tidak ada riwayat kontaminasi kecuali yang dijelaskan dalam subpasal ini.

Lihat Lampiran E untuk pengukurannya.

6 Pelaporan

6.1 Umum

Hasil pengukuran dan evaluasi yang diperoleh sesuai dengan Standar ini harus dilaporkan dengan menjelaskan sumber dan konstituen dari objek nano, media kultur dan serum, seperti yang dijelaskan dalam Pasal 6.2 hingga Pasal 6.6.

6.2 Nama objek nano dan informasi manufaktur

Nama, katalog dan nomor lot/*batch* objek nano serta informasi pemanufaktur termasuk nama, alamat dan informasi kontak harus dilaporkan.

6.3 Komposisi dan unsur logam yang disertakan dalam sampel objek nano

Tentukan material utama dan aksesori, material pelapis, material katalis, dan pengotor, termasuk jumlah yang diketahui atau terestimasi.

6.4 Media kultur dan serum

Nama, pemanufaktur dan nomor lot/*batch* media, jenis dan konsentrasi serum yang ditambahkan (% fraksi volume), nilai pH medium asli dan nilai pH selama penilaian, serta jenis dan konsentrasi aditif tambahan lainnya, jika ada, harus dilaporkan.

6.5 Hasil pengukuran

Berikut ini adalah hal-hal yang perlu dilaporkan untuk dosis individu suspensi kerja dan jangka waktu pengukuran. Namun, hasil pengujian kontaminan dapat dilaporkan untuk stok objek nano, bukan dosis individu.

Pelaporan ion logam, komponen media kultur, dan kontaminan tidak diperlukan jika toksisitas tidak teramati untuk dosis individual suspensi kerja.

5.5 Contamination

Contamination can be a source of additional toxic action. Endotoxin and mycoplasma shall be determined with appropriate methods.

Endotoxin measurement are available with LAL test (see ISO 29701), the chromogenic-based LAL assays^[22], the MAT^[23], recombinant Factor C test^[24] and high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry methods^[25].

Mycoplasma contamination is one of the major problems in vitro assay. Mycoplasma can be detected by PCR based methods^[26], culture methods^[27] and fluorescence microscopy method^[28].

Nano-object sample shall be treated aseptically. It shall be confirmed that there is no history of contamination except that which is described in this subclause.

See Annex E for measurements

6 Reporting

6.1 General

Measurement and evaluation results obtained according to this Standard shall be reported describing the source and the constituents of the nano-objects, culture medium and serum, as described in 6.2 to 6.6.

6.2 Name of nano-objects and manufacturing information

Name, catalogue and lot/batch number of nano-objects and manufacturer information including name, address and contact information shall be reported.

6.3 Composition and metallic elements included in the nano-object sample

Define principal and accessory materials, coating materials, catalytic materials and impurities, including their known or estimated quantity.

6.4 Culture medium and serum

Name, manufacturer and lot/batch number of the medium, type and concentration of added serum (volume fraction %), pH values of original medium and pH values during assessment, and type and concentration of other additives, if any, shall be reported.

6.5 Measurement results

The following are required to report for individual doses of working suspensions and measurement time frame. However, the results of the test for contaminants can be reported for the stock of nano-objects instead of individual doses.

Reporting of metal ions, culture medium components and contaminants are not required when toxicity is not observed for the individual doses of working suspension.

- Stabilitas suspensi kerja
 - a) perubahan ukuran yang representatif dan perubahan konsentrasi,
 - b) tanggal pengukuran,
 - c) metode pengukuran yang digunakan untuk perubahan ukuran dan perubahan konsentrasi yang representatif,
 - d) institusi pelaksana dan informasi keandalan data,
 - e) informasi pendukung tentang metode persiapan suspensi kerja, dan
 - f) informasi pendukung khusus lainnya jika ada;
- ion logam
 - a) nama ion logam dan konsentrasinya,
 - b) tanggal pengukuran,
 - c) metode pengukuran yang digunakan,
 - d) institusi pelaksana dan informasi keandalan data, dan
 - e) informasi pendukung khusus lainnya jika ada;
- komponen media kultur
 - a) konsentrasi protein dan kalsium,
 - b) tanggal pengukuran,
 - c) metode pengukuran yang digunakan untuk konsentrasi protein dan kalsium,
 - d) institusi pelaksana dan informasi keandalan data, dan
 - e) informasi pendukung khusus lainnya jika ada;
- kontaminasi
 - a) kontaminasi positif/negatif dan jenis kontaminasi,
 - b) tanggal pengukuran,
 - c) metode pengukuran yang digunakan,
 - d) institusi pelaksana dan keandalan informasi, dan
 - e) informasi pendukung khusus lainnya jika ada.

6.6 Metode opsional

Metode yang tidak tercantum dalam Standar ini harus dijelaskan dalam laporan dengan nama metode yang digunakan, informasi terperinci, keandalan, dan justifikasinya.

- Stability of working suspension
 - a) representative size change and concentration change,
 - b) date of measurement,
 - c) employed measurement methods for representative size change and concentration change,
 - d) performing institution and data reliability information,
 - e) supporting information on preparation method of working suspension, and
 - f) other special supporting information if any;
- metal ions
 - a) names of metal ions and their concentrations,
 - b) date of measurement,
 - c) employed measurement method,
 - d) performing institution and data reliability information, and
 - e) other special supporting information if any;
- culture medium components
 - a) protein and calcium concentrations,
 - b) date of measurement,
 - c) employed measurement methods for protein and calcium concentrations,
 - d) performing institution and data reliability information, and
 - e) other special supporting information if any;
- contamination
 - a) contamination positive/negative and type of contamination,
 - b) date of measurement,
 - c) employed measurement method,
 - d) performing institution and reliability information, and
 - e) other special supporting information if any.

6.6 Optional methods

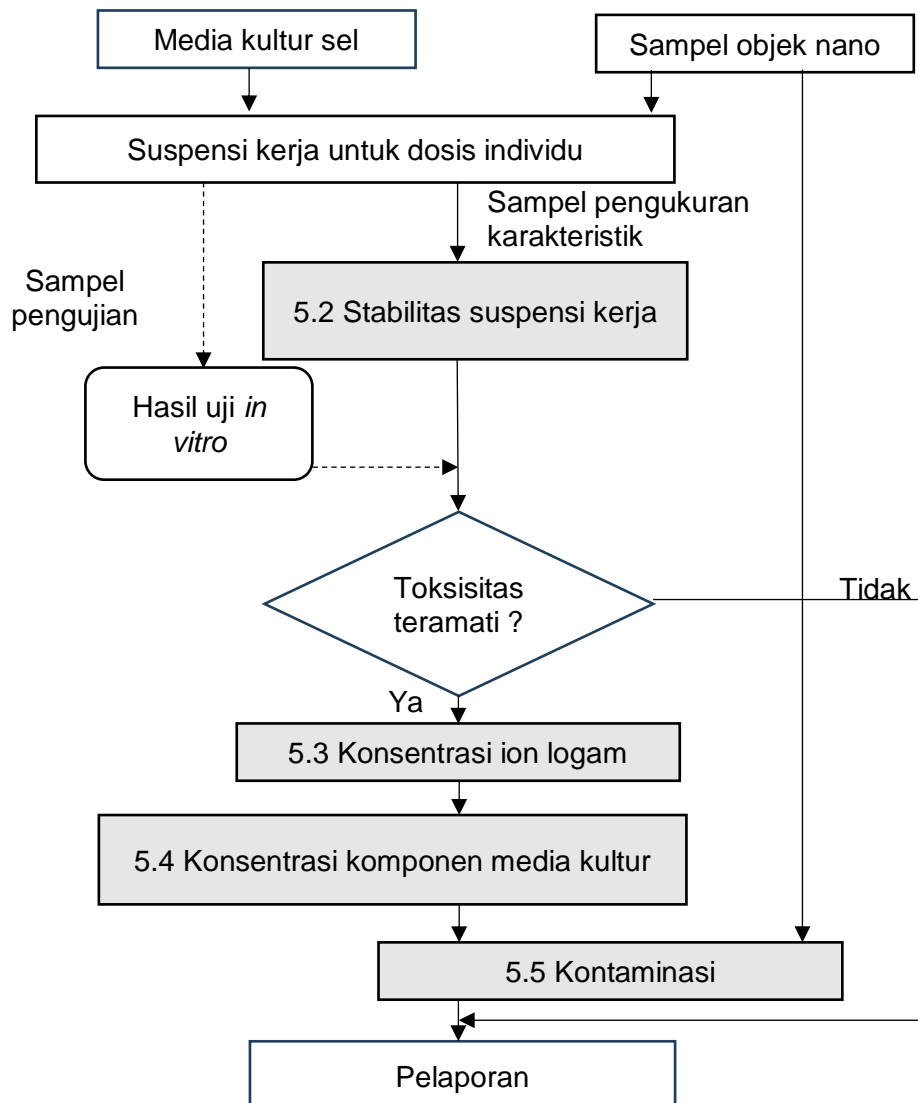
Methods not listed in this Standard shall be described in the report with the name of the methods employed, its detailed information, reliability and justification.

Lampiran A
(normatif)
Alur pengukuran

Skema yang menunjukkan tahapan pengukuran yang harus dilakukan berdasarkan Standar ini ditunjukkan pada Gambar A.1.

Pengukuran stabilitas, ion logam, dan komponen media kultur dilakukan untuk setiap dosis suspensi kerja yang dibuat dengan mencampurkan sampel objek nano dan media kultur sel.

Suspensi kerja dibagi menjadi dua bagian; satu untuk uji toksisitas (sampel uji) dan yang lainnya untuk pengukuran karakteristiknya (sampel pengukuran karakteristik). Pengukuran ion logam, komponen media kultur dan kontaminan dilakukan untuk sampel pengukuran karakteristik ketika efek toksisitas diamati untuk sampel pengujian. Pengukuran kontaminan dapat dilakukan untuk stok objek nano dan bukan dosis individu.



Gambar A.1 — Alur pengukuran

Annex A (normative) Flow of measurements

A schematic showing the steps at which measurements shall be made based on this Standard is shown in Figure A.1.

Measurements of stability, metal ions and culture medium components are made for each dose of the working suspension prepared by mixing nano-object sample and cell culture medium.

The working suspension is divided into two parts; one is for toxicity assay (assay sample) and the other for measurements of characteristics (characteristics measurement sample). Measurements of metal ions, culture medium components and contaminants are carried out for the characteristic measurement samples when a toxicity effect is observed for the assay sample. Measurements of contaminants can be made for the stock of nano-objects instead of individual doses.

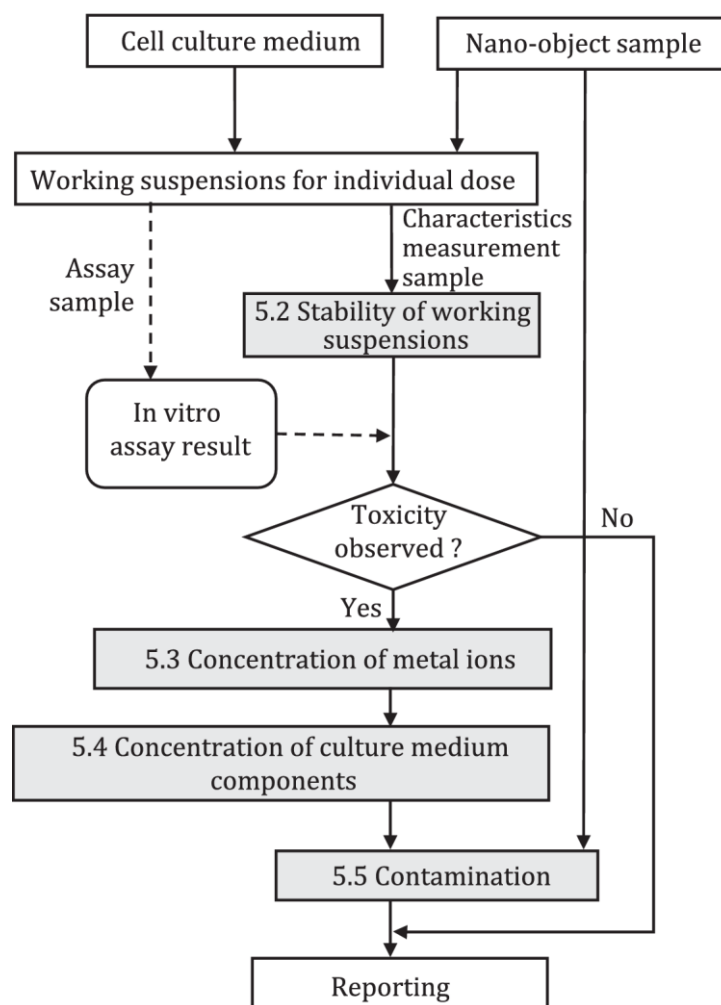


Figure A.1 — Flow of measurements

Lampiran B (informatif) **Pengukuran dan evaluasi stabilitas**

B.1 Umum

Contoh metode pengukuran stabilitas sampel objek nano disediakan untuk kepentingan pengguna. Pengguna diperingatkan bahwa metode ini belum tentu tervalidasi untuk digunakan dalam mengarakterisasi berbagai jenis sampel objek nano. Karena keragaman sampel objek nano, pengguna sebaiknya memilih metode yang cocok untuk mengevaluasi stabilitas suspensi kerja selama uji toksisitas *in vitro*.

Semua pengukuran sebaiknya dilakukan pada suspensi kerja atau suspensi objek nano yang disiapkan dengan cara yang sama seperti uji toksisitas *in vitro*. Stok sampel yang sama dari suspensi objek nano sebaiknya digunakan untuk pengukuran dan untuk percobaan penilaian toksisitas *in vitro*. Hasil evaluasi perubahan nilai sebaiknya dinyatakan dalam satuan persen; yaitu, membagi perubahan nilai selama uji toksisitas *in vitro* dengan nilai awal. Disarankan untuk melakukan multi pengukuran (setidaknya tiga kali) dan menyajikan data sebagai rata-rata pengukuran.

B.2 Perubahan ukuran representatif dari partikel sekunder objek nano

Untuk memantau perubahan ukuran representatif dari partikel sekunder objek nano, pengguna sebaiknya memilih metode yang cocok dari DLS, LD dan SLS. Metode sebaiknya dipilih berdasarkan rentang ukuran yang dapat diamati dalam masing-masing prinsip pengukuran.

B.3 Perubahan konsentrasi objek nano

Untuk memantau perubahan konsentrasi sebagian besar jenis objek nano, metode pemantauan intensitas hamburan cahaya seperti DLS atau SLS dapat diterapkan, selama ukuran unit objek nano lebih besar daripada molekul protein dalam suspensi kerja. Metode TOC dapat diterapkan pada analisis objek nano berbasis karbon, ketika suhu pembakaran atau suhu pirolisis objek nano berbasis karbon dan media kultur berbeda. Jika karbon dasar dikurangi secara akurat, metode TOC juga dapat diterapkan. Metode absorpsi UV-Vis diterapkan pada semua kelompok objek nano ketika absorbansi UV-Vis dapat dipisahkan dari absorbansi latar belakang media kultur. Pengukuran transmisi sinar-X dapat diterapkan pada sampel objek nano dengan latar belakang tinggi dalam metode absorpsi UV-Vis, namun secara praktis terbatas pada objek nano tersuspensi dengan nomor atomik kurang daripada karbon.

Annex B (informative) **Measurement and evaluation of stability**

B.1 General

Examples of measurement methods of stability of nano-object samples are provided for the benefit of the user. The user is cautioned that these methods have not necessarily been validated for use in characterizing multiple types of nano-object samples. Due to the diversity of nano-object samples, the user should select an appropriate method to evaluate the stability of working suspension during in vitro toxicity assays.

All measurements should be performed on working suspension or the nano-object suspensions prepared in the same manner as the in vitro toxicity assay. The same sample stocks of the nano-object suspension should be used for the measurements and for the in vitro toxicity assessment experiments. Evaluated results of the change of values should be expressed in the units of percent; namely, dividing the change of values during an in vitro toxicity assay by the initial values. It is recommended to perform multiple measurements (at least three times) and to present the data as an average of the measurements.

B.2 Representative size change of secondary particles of nano-objects

In order to monitor the changes of the representative size of secondary particles of nano-objects, the user should select an appropriate method from DLS, LD and SLS. The method should be selected by observable size range in the respective measurement principles.

B.3 Change of concentration of nano-objects

In order to monitor the changes of the concentration of a majority of the types of nano-objects, light scattering intensity monitoring methods such as DLS or SLS can be applied, as long as the unit size of the nano-object is larger than protein molecules in the working suspensions. TOC method can be applicable to carbon-based nano-object analysis, when combustion temperatures or pyrolysis temperatures of the carbon-based nano-object and the culture media are different. In the case that the background carbon is subtracted accurately, the TOC method can be also applicable. UV-Vis absorption method is applied to all groups of nano-objects when their UV-Vis absorbance can be decoupled from the culture medium background absorbance. X-ray transmission measurement is applicable to nano-object samples with high background in the UV-Vis absorption method, however, it is practically restricted to suspended nano-objects of atomic numbers less than carbon.

Lampiran C (informatif) **Pengukuran ion logam**

C.1 Pemisahan ion dari materi partikulat

Membran C-U/F dengan berat molekul fraksinasi optimal dipilih tergantung pada ukuran partikel nano. Kondisi C-U/F, yaitu dapat digunakan untuk memisahkan materi partikulat dan ion logam. Pada U/F, percepatan sentrifugal yang relevan dan durasi sentrifugasi sebaiknya diatur secara memadai untuk memulihkan filtrat yang mengandung ion dengan memeriksa hubungan pemulihan alur versus durasi sentrifugasi atau percepatan sentrifugal ^{[1],[22],[23]}.

Membran filter dapat mengadsorpsi ion dan harus diuji sebelum digunakan^[24].

Sebagai alternatif, sentrifugasi dapat digunakan terutama untuk objek nano logam. Kondisi sentrifugasi, yaitu akselerasi sentrifugal dan durasi sentrifugasi juga sebaiknya diatur dengan tepat untuk memulihkan larutan yang mengandung ion dengan memeriksa kemampuan absorpsi ion yang sesuai dengan menggunakan standar konsentrasi sebelumnya.

Filtrat atau supernatan dianalisis dengan metode yang dijelaskan dalam Pasal C.2.

C.2 Pengukuran

C.2.1 Kriteria pemilihan metode

ICP-MS adalah teknik yang sangat sensitif dan dapat mendeteksi level bagian per triliun. Di sisi lain, AAS sangat dapat diandalkan.

Jika zat pengkelat untuk pengukuran kolorimetri sesuai untuk mendeteksi ion logam yang diharapkan, metode kolorimetri dapat digunakan. Agen pengkelat sebaiknya memiliki spesifisitas substrat yang tinggi, dan tidak ada reaktivitas silang. Jika tidak ada zat pengkelat yang sesuai untuk ion logam yang diharapkan, metode kolorimetri sebaiknya tidak digunakan.

C.2.2 Spektrometri emisi plasma atomik terkopel secara induktif

Kurva kalibrasi untuk ion logam yang diminati perlu dilakukan dengan menggunakan larutan standar ion logam.

Pengukuran ICP-AES sebaiknya dilakukan sesuai dengan ISO 11885^[25].

C.2.3 Spektrometri massa plasma terkopel secara induktif

Pra-perlakuan suspensi kerja dan pembuatan kurva kalibrasi dilakukan sesuai dengan Pasal C.1.

Pengukuran direkomendasikan untuk mengikuti standar yang relevan dari ISO 17294-1^[26] dan ISO 17294-2^[27].

Annex C (informative) **Measurement of metal ions**

C.1 Separation of ions from particulate matter

C-U/F membrane with an optimal fractionation molecular weight is selected depending on the size of nanoparticles. Conditions of C-U/F, namely can be employed in order to separate particulate matter and metal ions. In the U/F, a relevant centrifugal acceleration and duration of centrifugation should be adequately set to recover the filtrate containing ions by checking relationship a plot recovery versus duration of centrifugation or centrifugal acceleration^{[1],[22],[23]}.

The filter membrane can adsorb ions and it shall be tested before use^[24].

Alternatively, centrifugation can be employed especially for metal nano-objects. Conditions of the centrifugation, namely centrifugal acceleration and duration of centrifugation should also be adequately set to recover the solution containing ions by checking capability of absorption of corresponding ion using concentration standard previously.

The filtrate or supernatant is analysed by the methods described in Clause C.2.

C.2 Measurements

C.2.1 Method choice criteria

ICP-MS is a highly sensitive technique and can detect the level of parts per trillion. On the other hand, AAS is highly reliable.

If a chelating agent for the colorimetric measurement is suitable for detection of the expected metal ion, the colorimetric method can be employed. The chelating agent should have high specificity of substrate, and no cross-reactivity. When there is no suitable chelating agent for expected metal ion, colorimetric method should not be employed.

C.2.2 Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry

Calibration curves for the metal ions of interest are necessary using standard solutions of the metal ion.

Measurement of ICP-AES should be made in accordance with ISO 11885^[25].

C.2.3 Inductively coupled plasma mass spectrometry

Pre-treatment of the working suspension and generation of the calibration curves are conducted in accordance with Clause C.1.

The measurements are recommended to follow the relevant standards of ISO 17294-1^[26] and ISO 17294-2^[27].

C.2.4 Spektrometri absorpsi atomik

Kurva kalibrasi untuk ion-ion yang diminati perlu dilakukan dengan menggunakan larutan standar ion-ion tersebut.

C.2.5 Metode kolorimetri

Jika ion logam dalam suspensi kerja memiliki pita absorpsi karakteristik dengan/tanpa pengkelat pada bagian tampak atau ultraviolet, metode kolorimetri dapat digunakan untuk menentukan konsentrasinya. Sebelum analisis kuantitatif, spektrum absorpsi diukur dan diidentifikasi untuk ion-ion tersebut. Pita absorpsi karakteristik yang tidak mengganggu ion lain dipilih untuk analisis.

C.2.6 Elektrode selektif ion

Elektrode selektif ion dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi ion terlarut dalam media^[35].

C.2.4 Atomic absorption spectrometry

The calibration curves for the ions of interest are necessary using standard solutions of the ions.

C.2.5 Colorimetric method

If metal ions in the working suspension have characteristic absorption band with/without chelator in the visible or ultraviolet region, the colorimetric methods can be used to determine the concentration. Before the quantitative analysis, the absorption spectra are measured and identified for the ions. A characteristic absorption band that does not interfere with that of other ions is selected for the analysis.

C.2.6 Ion selective electrode

Ion selective electrodes can be used to determine the concentration of dissolved ions in the medium^[35].

Lampiran D (informatif) **Pengukuran komponen media kultur**

D.1 Protein

Jika pemisahan materi partikulat dari zat pendispersi dapat dilakukan dengan sentrifugasi/ultra-sentrifugasi^[18], konsentrasi protein dalam media ditentukan dengan metode BCA^[19], metode Bradford^[20] atau metode Lowry^[21] dengan menggunakan BSA sebagai standar protein.

Jika pemisahan materi partikulat dari zat pendispersi rumit, metode AF4 dapat digunakan.

Ketika media kultur tidak mengandung protein, seperti dalam kasus media bebas serum, evaluasi konsentrasi protein tidak diperlukan.

D.2 Kalsium

Objek nano dipisahkan dari suspensi kerja menggunakan C-U/F. Sentrifugasi atau ultrasentrifugasi juga dapat digunakan jika material dapat dengan mudah dipisahkan dari suspensi kerja. Dalam U/F, membran yang relevan yang memiliki berat molekul fraksinasi optimal dipilih untuk memisahkannya, tergantung pada ukuran objek nano. Ketika C-U/F digunakan, kondisi C-U/F, yaitu intensitas sentrifugal dan durasi sentrifugasi sebaiknya diatur secara memadai untuk sepenuhnya memulihkan larutan yang mengandung kalsium (Ca^{2+}). Setelah pemisahan objek nano yang cocok dari suspensi kerja, kandungan Ca^{2+} dari media kultur dapat ditentukan dengan ICP-AES, ICP-MS atau AAS. Jika objek nano dipisahkan dari suspensi kerja dengan sentrifugasi atau ultrasentrifugasi, konsentrasi Ca^{2+} dalam media suspensi dapat ditentukan dengan metode kolorimetri (lihat Lampiran C).

D.3 Lain-lain

Komponen media kultur lain yang penting untuk pertumbuhan sel uji yang sehat dapat dilaporkan. Untuk mengukur konsentrasi komponen-komponen tersebut dalam suspensi kerja, materi partikulat dipisahkan dengan cara yang sama seperti untuk pengukuran Ca^{2+} . Komponen-komponen tersebut kemudian diukur dengan metode yang cocok. Rincian metode pengukuran untuk komponen-komponen tersebut sebaiknya dijelaskan dalam pelaporan.

Annex D (informative) **Measurement of culture medium components**

D.1 Proteins

If separation of the particulate matter from the dispersant is achievable by centrifugation/ultra-centrifugation^[18], the protein concentration in the medium is determined by the BCA method^[19], Bradford method^[20] or Lowry method^[21] using BSA as the protein standard.

If separation of the particulate matter from dispersant is complicated, the AF4 method can be employed.

When the culture medium does not include any protein, such as in the case of a serum-free medium, evaluation of protein concentration is not required.

D.2 Calcium

Nano-objects are separated from the working suspension by C-U/F. Centrifugation or ultracentrifugation can also be employed if materials can be easily separated from the working suspension. In the U/F, relevant membrane having an optimal fractionation molecular weight is selected to separate them, depending on the size of nano-objects. When C-U/F is employed, conditions of C-U/F, namely centrifugal intensity and duration of centrifugation should be adequately set up to fully recover the solution containing calcium (Ca^{2+}). After the appropriate separation of nano-objects from working suspension, Ca^{2+} content of the culture medium can be determined by ICP-AES, ICP-MS or AAS. If nano-objects are separated from the working suspension by centrifugation or ultracentrifugation, Ca^{2+} concentration in the suspension medium can be determined by the colorimetric method (see Annex C).

D.3 Others

Other culture medium components that are important for healthy growth of the test cells can be reported. In order to measure the concentration of those component(s) in the working suspension, the particulate matter is separated in the same way as for the Ca^{2+} measurement. Those component(s) are then measured by appropriate methods. Details of the measurement methods for those component(s) should be described in the reporting.

Lampiran E (informatif) Kontaminasi

E.1 Umum

Menurut riwayat pengiriman objek nano dan pengoperasian uji *in vitro*, kontaminasi dapat menjadi sumber tindakan toksik. Endotoksin dan mikoplasma dari kontaminan dapat diperiksa dengan metode yang cocok.

E.2 Endotoksin

Endotoksin, juga dikenal sebagai LPS, ditemukan dalam membran luar bakteri Gram negatif. Endotoksin adalah lipid dan polisakarida dengan berat molekul tinggi yang terdiri dari O-antigen. Endotoksin memiliki stabilitas panas yang tinggi dan tidak mungkin dihancurkan dalam kondisi sterilisasi biasa. Endotoksin memengaruhi pertumbuhan dan fungsi sel dan merupakan sumber toksisitas.

Uji LAL (lihat ISO 29701^[28]), uji LAL berbasis kromogenik^[29], MAT^[30], uji Faktor C rekombinan^[31], dan kromatografi cair kinerja tinggi yang digabungkan dengan metode spektrometri massa^[32] merupakan uji yang digunakan untuk menentukan keberadaan endotoksin.

Terdapat bukti bahwa partikel nano dapat mengganggu uji LAL karena sifat optiknya atau interaksinya dengan enzim dalam reaksi pembekuan^[32].

E.3 Mikoplasma

Mikoplasma adalah salah satu genus bakteri. Mikoplasma tidak memiliki dinding sel di sekitar membran dan sifat ini membuat bakteri tersebut resisten terhadap antibiotik. Mikoplasma adalah penghalang utama dalam pengujian *in vitro* dan dapat menjadi sumber hasil positif palsu.

Mikoplasma dapat dideteksi dengan metode berbasis PCR^[33], metode kultur^[34] dan metode mikroskop fluoresens^[35].

Annex E (informative) **Contamination**

E.1 General

According to the delivery history of nano-object and the operation of in vitro test, contamination can be the sources of toxic action. Endotoxin and mycoplasma of contaminants can be examined with appropriate methods.

E.2 Endotoxin

Endotoxins, also known as LPS, are found in the outer membrane of Gram-negative bacteria. Endotoxins are high molecular weight lipid and polysaccharide composed of O-antigen. Endotoxins are high heat stability and it is impossible to destroy them under regular sterilizing conditions. Endotoxins affect cell growth and function and are a source of toxicity.

LAL test (see ISO 29701^[28]), the chromogenic-based LAL assays^[29], the MAT^[30], recombinant Factor C test^[31] and high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry methods^[32] are tests used to determine the presence of endotoxin.

There is evidence that nanoparticles can interfere with the LAL assay due to their optical properties or interaction with enzymes in clotting reactions^[32].

E.3 Mycoplasma

Mycoplasma is one of genus of bacteria. Mycoplasma has no cell wall around membranes and this character make them resistant to antibiotics. Mycoplasma is a major hindrance in in vitro assay and can be a source of false-positive results.

Mycoplasma can be detected by PCR-based methods^[33], culture methods^[34] and fluorescence microscopy method^[35].

Bibliografi

- [1] Horie M., Kato H., Fujita K., Endoh S., Iwahashi H. In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* 2012, 25 pp. 605–619
- [2] Horie M., Nishio K., Fujita K., Endoh S., Miyauchi A., Saito Y. et al. Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. *Chem. Res. Toxicol.* 2009, 22 pp. 543–553
- [3] Kato H., Suzuki M., Fujita K., Horie M., Endoh S., Yoshida Y. et al. Reliable size determination of nanoparticles using dynamic light scattering method for in vitro toxicology assessment. *Toxicol. In Vitro.* 2009, 23 pp. 927–934
- [4] Teeguarden J.G., Hinderliter P.M., Orr G., Thrall B.D., Pounds J.G. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicol. Sci.* 2007, 95 (2) pp. 300–312
- [5] ISO/TR 13097:2013, *Guidelines for the characterization of dispersion stability*
- [6] Kato H., Fujita K., Horie M., Suzuki M., Nakamura A., Endoh S. et al. Dispersion characteristics of various metal oxide secondary nanoparticles in culture medium for in vitro toxicology assessment. *Toxicol. In Vitro.* 2010, 24 pp. 1009–1018
- [7] ISO 13320:2020, *Particle size analysis — Laser diffraction methods*
- [8] Kato H., Shinohara N., Nakamura A., Horie M., Fujita K., Takahashi K. et al. Characterization of fullerene colloidal suspension in a cell culture medium for in vitro toxicity assessment. *Mol. Biosyst.* 2010, 6 pp. 1238–1246
- [9] Schierz A., Zanker H. Aqueous suspensions of carbon nanotubes: Surface oxidation, colloidal stability and uranium sorption. *Environ. Pollut.* 2009, 157 pp. 1088–1094
- [10] Saleh B.S., Pfefferle D.L., Elimelech M. Aggregation kinetics of multiwalled carbon nanotubes in aquatic systems: measurements and environmental implications. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42 pp. 7963–7969
- [11] Sato Y., Shibata K., Kataoka H., Ogino S., Bunshi F., Yokoyama A. et al. Strict preparation and evaluation of water-soluble hat-stacked carbon nanofibers for biomedical application and their high biocompatibility: influence of nanofiber-surface functional groups on cytotoxicity. *Mol. Biosyst.* 2005, 1 pp. 142–145
- [12] ISO 13317-3:2001, *Determination of particle size distribution by gravitational liquid sedimentation methods — Part 3: X-ray gravitational technique*
- [13] Kato H., Mizuno K., Shimada M., Nakamura A., Takahashi K., Hata K. et al. Observations of bound Tween80 surfactant molecules on single-walled carbon nanotubes in an aqueous solution. *Carbon.* 2009, 47 pp. 3434–3440
- [14] Rahman et al. Online desalting and sequential formation of analyte ions for mass spectrometry characterization of untreated biological samples. *Chem. Commun. (Camb.)* 2019, 55 (62) pp. 9188–9191
- [15] Kaña et al. Internal standardisation for arsenic and its species determination using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta.* 2019, 192 pp. 86–92
- [16] Tubaon et al. One-step selective electrokinetic removal of inorganic anions from small volumes and its application as sample clean-up for mass spectrometric techniques. *J. Chromatogr. A.* 2017, 1488 pp. 134–139

- [17] ISO/TS 21362:2018, *Nanotechnologies — Analysis of nano-objects using asymmetrical-flow and centrifugal field-flow fractionation*
- [18] Wang X., Xia T., Ntim S.A., Ji Z., George S., Meng H. et al. Quantitative techniques for assessing and controlling the dispersion and biological effects of multiwalled carbon nanotubes in mammalian tissue culture cells. *ACS Nano*. 2010, 4 pp. 7241–7252
- [19] Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. 1985, 150 pp. 76–85
- [20] Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976, 72 pp. 248–254
- [21] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951, 193 pp. 265–275
- [22] Horie M., Fujita K., Kato H., Endoh S., Nishio K., Komaba L.K. et al. Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics*. 2012, 4 pp. 350–360
- [23] Horie M., Fujita K., Kato H., Endoh S., Nishio K., Komaba L.K. et al. Ultrafine NiO particles induce cytotoxicity in vitro by cellular uptake and subsequent Ni(II) release. *Chem. Res. Toxicol*. 2009, 22 (8) pp. 1415–1426
- [24] Kennedy A.J., Hull M.S., Bednar A.J., Goss J.D., Gunter J.C., Bouldin J.L. et al. Fractionating nanosilver: importance for determining toxicity to aquatic test organisms. *Environ. Sci. Technol*. 2010, 44 (24) pp. 9571–9577
- [25] ISO 11885:2007, *Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)*
- [26] ISO 17294-1:2004, *Water quality — Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) — Part 1: General guidelines*
- [27] ISO 17294-2:2016, *Water quality — Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) — Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes*
- [28] ISO 29701, *Nanotechnologies — Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems — Limulus amoebocyte lysate (LAL) test*
- [29] Smulders S., Kaiser J., Zuin S., Van Landuyt K., Golanski L., Vanoirbeek J. et al. Contamination of nanoparticles by endotoxin: evaluation of different test methods. *Part. Fibre Toxicol*. 2012, 9 p. 41
- [30] Schindler S., von Aulock S., Daneshian M., Hartung T. Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood. *ALTEX*. 2009, 26 (4) pp. 265–277
- [31] Piehler M., Roeder R., Blessing S., Reich J. Comparison of LAL and rFC Assays—Participation in a Proficiency Test Program between 2014 and 2019. *Microorganisms*. 2020, 8 p. 418
- [32] Giannakou C., Aimonen K., van Bloois L., Catalán J., Geertsma R.E., Gremmer E.R. et al. Sensitive method for endotoxin determination in nanomedicinal product samples. *Nanomedicine (Lond.)*. 2019, 14 (10) pp. 1231–1246
- [33] Skinner W.S., Ong K.G. Modern Electrode Technologies for Ion and Molecule Sensing. *Sensors (Basel Switzerland)*. 2020, 20 p. 4568

- [34] Goto K., Kunita S., Terada E., Itoh T. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Mycoplasma pulmonis* from nasal, tracheal and oral swab samples of rats. *Jikken Dobutsu*. 1994, 43 (3) pp. 413–415
- [35] Ligasová A., Vydržalová M., Buriánová R., Brůčková K, Večeřová R, Janošťáková A, Koberna K. A new sensitive method for the detection of mycoplasmas using fluorescence microscopy. *Cells*. 2019, 8 p. 1510

Informasi perumus SNI

[1] Komite Teknis Perumusan SNI

Komite Teknis 07-03 Nanoteknologi

[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis Perumusan SNI

Ketua : Haznan Abimanyu
Wakil Ketua : A. Rachman Mustar
Sekretaris : Teguh Prakosa
Anggota : 1. Arief Udhiarto
2. Dwi Gustiono
3. Jimmy Pusaka
4. Oman Zuas
5. Pudji Untoro
6. Pudjiatmoko
7. Rachmat Wijaya
8. Setyo Purwanto

[3] Konseptor Rancangan SNI

Pudjiatmoko

[4] Sekretariat pengelola Komite Teknis Perumusan SNI

Direktorat Pengembangan Standar Mekanika, Energi, Infrastruktur, dan Teknologi Informasi
Badan Standardisasi Nasional