

Toksisitas Akut dan Subkronis Ramuan Ekstrak Kelor dan Klabet sebagai Pelancar ASI dan Penambah Gizi

Lucie Widowati¹, M. Wien Winarno², Putri Retno Intan²

¹Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik,

²Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

email: lucie.widowati@yahoo.com

Diterima : 8 November 2013

Direvisi : 29 November 2013

Disetujui : 2 Juni 2014

Abstract

*Insufficient breast milk intake from a mother to their babies may cause a poor infant growth. We have conducted a research on mixture of klabet seed extracts (*Trigonella foenum-graecum* L.) and kelor leaf extract (*Moringa oleifera* Lamk.) (1:1) for increasing breast milk production in nursing mothers and nutritional supplement for infants. The study is a completely randomized design. We used white rats (*Rattus norvegicus*), Wistar strain, as many as 50, that were divided into 5 dose groups for the acute toxicity testing and 40 rats in 4 dose groups for the sub-chronic toxicity testing. The acute toxicity testing of fenugreek seed extracts and moringa leaf extracts (1:1) results in a pseudo value $LD_{50} > 4,000$ mg/200g bw, therefore we classified the materials to practically non-toxic (PNT). For the subchronic toxicity testing, the result showed a normal state on liver and kidney function.*

Keywords : *Breast milk, Extract klabet (*Trigonella foenum-graecum*), Extract kelor (*Moringa oleifera*), Acute and subchronic toxicity*

Abstrak

Pengeluaran ASI (Air Susu Ibu) yang tidak lancar pada seorang ibu yang baru melahirkan secara tidak langsung akan menyebabkan bayi berkembang sangat buruk. Telah dilakukan penelitian untuk menilai manfaat ramuan campuran dua tanaman obat, yaitu Klabet (*Trigonella foenum-graecum* L.) dan daun kelor (*Moringa oleifera*) 1:1 untuk pelancar ASI dan penambah gizi bagi balita. Tujuan penelitian ini memberikan landasan ilmiah toksisitas akut dan toksisitas subkronis ramuan pelancar air susu ibu. Desain penelitian ini adalah rancangan acak lengkap. Pada uji toksisitas akut digunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar sebanyak 50 ekor yang dibagi dalam 5 kelompok dosis. Pada uji toksisitas subkronis digunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*), galur Wistar sebanyak 40 ekor yang dibagi dalam 4 kelompok dosis. Hasil penelitian perhitungan LD_{50} ekstrak biji klabet dan daun kelor (1:1) menghasilkan harga LD_{50} semu > 4.000 mg/200g bb sehingga campuran bahan tersebut termasuk dalam golongan bahan *practically non toxic* (PNT). Pada uji toksisitas subkronis pemberian ramuan ekstrak klabet dan kelor (1:1) masih menunjukkan keadaan normal pada fungsi hati dan ginjal.

Kata kunci : *ASI, Ekstrak klabet (*Trigonella foenum-graecum* L.), Ekstrak kelor (*Moringa oleifera*), Toksisitas Akut dan subkronis*

Pendahuluan

Pengeluaran ASI (Air Susu Ibu) yang tidak lancar pada seorang ibu yang baru melahirkan secara tidak langsung akan menyebabkan bayi berkembang sangat buruk karena menyusui merupakan suatu cara memberi makan bayi yang ideal untuk empat sampai enam bulan pertama sejak di-

lahirkan, karena ASI dapat memenuhi kebutuhan gizi bayi. Setelah itu ASI menjadi tidak cukup mengandung protein dan kalori, maka seorang bayi mulai memerlukan minuman makanan pendamping ASI¹. Hasil suatu survei melaporkan bahwa 38% ibu menghentikan pemberian ASI bagi bayi dengan alasan produksi ASI tidak mencukupi.²

Sebagian masyarakat Indonesia mempunyai kebiasaan minum jamu setelah melahirkan dan berdasarkan suatu survei, sejumlah pengguna jamu sebagian besar adalah wanita.³

Indonesia mempunyai 30.000 jenis tanaman obat, salah satu produk yang dikembangkan adalah untuk pelancar ASI. Diperlukan inovasi baru untuk mendapatkan produk sebagai pelancar ASI disamping dapat meningkatkan nilai gizi ASI.

Biji klabet (*Trigonella foenum-graecum* L.) di daerah Sumatera digunakan sebagai bumbu masak terutama untuk masakan kari. Biji klabet mempunyai potensi yang besar untuk dapat dikembangkan sebagai obat, karena dianggap dapat menyaingi tanaman *Dioscorea sp.* sebagai penghasil diosgenin, prekursor hormon kontrasepsi, dan kaya fitoestrogen.⁴ Di Eropa klabet digunakan sebagai pelancar ASI.⁵ Simplisia biji klabet mengandung minyak lemak 20-30%, lendir, trigonelin sebagai basa kuaterner, nikotinamida, kolina, dan saponin, saponin steroid antara lain diosgenin dan dilaporkan mengandung 0,8 - 2,2 % sebagai basa bebas.⁶

Daun kelor mirip dengan daun katuk, daunnya enak dimakan menjadi beragam masakan. Keunggulan daun kelor terletak pada kandungan nutrisinya, terutama golongan mineral dan vitamin. Setiap 100 g daun kelor mengandung 3390 SI vitamin A, dua kali lebih tinggi dari bayam dan tiga puluh kali lebih tinggi dari buncis. Daun kelor juga tinggi kalsium, sekitar 440 mg/100 g, serta fosfor 70 mg/100 g.⁷ Aroma daun kelor agak langu, namun aroma berkurang ketika daun mudanya diolah menjadi sayur bening atau sayur bobor.

Telah dilakukan penelitian untuk menilai manfaat ramuan dengan formula ekstrak biji klabet dan ekstrak daun kelor (1:1) sebagai pelancar ASI dan penambah gizi bagi balita. Bayi perlu mendapatkan makanan pendamping ASI kemudian pem-

berian ASI di teruskan sampai anak berusia dua tahun.⁸

Penggunaan yang terus menerus pada suatu produk dapat menyebabkan hal yang tidak diinginkan terhadap organ tubuh. Sebagai tanaman obat yang akan dikembangkan untuk pelancar ASI dan penambah gizi, tentunya diharapkan akan digunakan dalam jangka waktu yang cukup panjang. Dengan penggunaan terus menerus, keamanan suatu produk adalah hal yang paling penting untuk diketahui.

Penelitian ini bertujuan untuk memberikan landasan ilmiah keamanan ramuan pelancar air susu melalui pemeriksaan toksisitas akut dan toksisitas subkronis.

Toksisitas akut dilakukan untuk menentukan nilai toksisitas akut (LD_{50}) yang akan memberikan gambaran besarnya daya racun suatu ramuan. Makin kecil harga LD_{50} suatu zat, maka makin besar daya racun zat tersebut. Toksisitas subkronis dilakukan untuk melihat gambaran kimia darah dengan mengukur jumlah sel darah merah, sel darah putih, kadar Hb serta gambaran biokimia darah dengan mengukur kadar SGOT, SGPT, ureum, kreatinin dan melihat gambaran histopatologi organ penting, yaitu hati, ginjal, lambung, jantung paru, serta ovarium dan uterus.

Metode

Desain penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan jenis penelitian eksperimental. Penelitian dilakukan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan tahun 2011 dengan persetujuan etik dari komisi etik Badan Litbangkes No. KE.01.06/EC/377/2011.

Hewan uji

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini tikus putih galur Wistar, jantan dan betina umur 3 bulan, bobot badan 160–180 gram. Asal hewan dari Laboratorium Hewan Coba, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan.

Hewan

makanan diberi dalam bentuk pelet dengan komposisi makanan standar untuk tikus: selulosa 6%; protein 16,5%; lemak 3% dan mineral-mineral 6,6%. Untuk satu hari tikus diberi makanan 20 gram/hari/ekor. Air minum menggunakan air kran (PAM) dan minum yang diperlukan untuk setiap hewan 1-2 mL/g makanan, diberikan ad- libitum.

Estimasi besar sampel

Toksikitas akut oral untuk setiap ramuan memerlukan tikus putih sebanyak 25 ekor jantan dan 25 ekor betina. Toksikitas subkronis untuk setiap ramuan memerlukan tikus putih sebanyak 50 ekor jantan dan 50 ekor betina. Pengelompokan Hewan Percobaan dilakukan secara random berdasarkan kelompok umur dan bobot badannya.

Variabel

Variabel bebas meliputi perlakuan (tingkatan dosis dari ramuan) dan waktu. Variabel terikat meliputi 1) Toksikitas akut oral: kematian, dan bobot badan; dan 2) Toksikitas subkronis: bobot badan, parameter kimia darah dan biokimia darah serta kelainan histopatologi.

Bahan dan cara kerja

Bahan uji yang digunakan adalah biji klabet (*Trigonella foenum-graecum*) dan daun kelor (*Moringa oleifera*) diperoleh dari petani di Jawa Timur dan telah diidentifikasi di Pusat Biologi Nasional, LIPI, Bogor. Bahan dikeringkan, digiling dan diayak sehingga menjadi serbuk.

Pembuatan ekstrak daun kelor⁹

Serbuk simplisia daun kelor ditimbang dan direndam dengan etanol 70 % selama 3 hari, kemudian saring dan uapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental. Sisa etanol dihilangkan dengan diuapkan kembali

menggunakan penangas air pada suhu lebih kurang 40°C. Ekstraksi diulangi pada ampas. Hasil keseluruhan ekstrak yang telah diuapkan dengan penangas air disatukan dan ditimbang untuk mendapatkan rendemen.

Pembuatan Ekstrak Biji Klabet¹⁰

Serbuk simplisia biji klabet ditimbang dan direndam dengan etanol 50 % selama 1 hari, kemudian disaring dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental. Etanol dihilangkan dengan cara yang sama seperti pembuatan ekstrak daun kelor.

Pembuatan formula ramuan

Formula ramuan uji dibuat dengan cara mencampurkan ekstrak kering biji klabet dan daun kelor dengan perbandingan 1:1.

Uji toksikitas akut (LD₅₀) menggunakan tikus¹¹

Prinsip pengujian adalah bahwa pemberian dosis tunggal suatu bahan uji secara oral dapat memperlihatkan efek toksis sebanyak 50 ekor tikus terdiri atas 25 ekor jantan dan 25 ekor betina, dibagi dalam 5 kelompok dosis. Setiap kelompok dosis terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina.

Kelompok I diberi ramuan uji dengan dosis 4000 mg/200 g bb; Kelompok II: dosis 3360 mg/200 g bb; Kelompok III: dosis 2800 mg/200 g bb; Kelompok IV: dosis 2400 mg/200 g bb; dan Kelompok V: dosis 2000 mg/200 g bb

Observasi

Observasi dilakukan setelah 4 jam pemberian bahan uji, meliputi kesehatan tikus atau gejala klinis yang timbul, penimbangan bobot badan setiap 2 hari, dan ada tidaknya tikus yang mati. Untuk tikus yang mati pada saat percobaan berlangsung dilakukan pemeriksaan *gross pathology* (patologi makro). Selanjutnya penga-

matan dilanjutkan selama 14 hari untuk melihat adanya tikus yang mati. Pada akhir penelitian, tikus yang masih hidup dilakukan pembiusan menggunakan ketamin 8-10 mg/kg bb, diotopsi dan dilakukan pengamatan secara makroskopis. Apabila ada kecurigaan dilakukan pemeriksaan histopatologi.

Uji toksisitas subkronis menggunakan tikus¹¹

Prinsip pengujian ini adalah melihat efek toksik ramuan dengan pemberian jangka panjang, menggunakan minimal 3 tingkatan dosis ramuan yang berbeda, dan satu kelompok kontrol. Ketiga dosis ramuan, yaitu satu dosis yang tidak menimbulkan efek, satu dosis yang memberikan efek farmakologi dan satu atau lebih dosis yang diperkirakan memperlihatkan efek toksik.

Sebelum percobaan dimulai, tikus diaklimatisasi di dalam ruangan percobaan (suhu 27°C) selama kurang lebih 7 hari, dalam kandang ukuran 20 x 20 yang berisi masing-masing 3 ekor. Tikus dikelompokkan secara acak sedemikian rupa sehingga penyebaran berat tubuh merata untuk semua kelompok. Tikus dibagi dalam 8 kelompok, yang terdiri dari 4 kelompok jantan @ 5 ekor dan 4 kelompok betina @ 5 ekor. Sebelum pemberian bahan uji, masing-masing hewan uji ditimbang.

Pemberian bahan uji

Hewan dipuaskan selama 16 sampai 18 jam. Bahan uji diberikan secara oral setiap hari selama 45 hari dan 90 hari. Selama penelitian diamati kesehatan hewan, antara lain gejala-gejala umum atau kelainan yang dijumpai, seperti diare, tremor dan demam.

Berat badan : penimbangan berat badan dilakukan sebelum pemberian bahan uji, kemudian setiap minggu selama masa pemberian bahan uji.

Pengukuran gambaran darah meliputi Hb, jumlah sel darah merah dan sel darah putih, serta pemeriksaan biokimia darah yang meliputi SGOT, SGPT (fungsi hati), ureum dan kreatinin (fungsi ginjal). Pemeriksaan histopatologi dilakukan terhadap organ penting yaitu hati, ginjal, paru, jantung, lambung serta ovarium dan uterus (pada tikus betina).

Masa *Recovery*

Setelah masa observasi berakhir, sebagian hewan uji dibiarkan hidup selama 2 minggu untuk mengetahui apakah sifat toksik bahan uji yang dipakai bersifat reversibel. Hewan uji yang dibiarkan hidup tersebut adalah yang diberi dosis terbesar dan kontrol.

Uji toksisitas subkronis selama 45 hari dan 90 hari

40 ekor tikus dibagi dalam 4 kelompok, meliputi : Kelompok I: dosis 30 mg/200 g bb; Kelompok II: dosis 100 mg/200 g bb; Kelompok III: dosis 300 mg/200 g bb; Kelompok IV: kontrol (akuades). Semua kelompok diperlakukan selama 45 hari, dan 90 hari kemudian diambil darahnya untuk pemeriksaan kimia darah dan biokimia darah, kemudian tikus diotopsi diambil organnya (hati, ginjal, paru, jantung dan lambung, uterus dan ovarium).

Sementara itu pada kelompok V (masa *recovery*) hewan tetap dibiarkan hidup selama 2 minggu, kemudian diperlakukan seperti kelompok I-IV.

Setelah 45 hari dan 90 hari, hewan dipuaskan selama 16 sampai 18 jam. Hewan dianastesi dengan inhalasi menggunakan eter dan dilakukan pengambilan darah sebanyak 5 mL dari vena jugularis dengan hati-hati menggunakan jarum suntik ukuran 22G 1¹/₂ TW (0,7 x 38 mm). Darah ditempatkan dalam tabung sentri -

fuge yang bersih dan kering, disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3.000 rpm, lalu segera dipisahkan darah dan serum.

Pemeriksaan gambaran darah^{11,12}

Pemeriksaan gambaran darah yang dilakukan berupa pengukuran sel darah merah, sel darah putih, dan hemoglobin menggunakan mikroskop dan perhitungan jumlah dengan bilik Meubaeur.

Pemeriksaan hemoglobin dilakukan dengan melakukan penyiapan cuplikan sampel dan dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Pemeriksaan biokimia darah^{11,12}

Pemeriksaan biokimia darah dilakukan terhadap kadar SGOT, SGPT, ureum

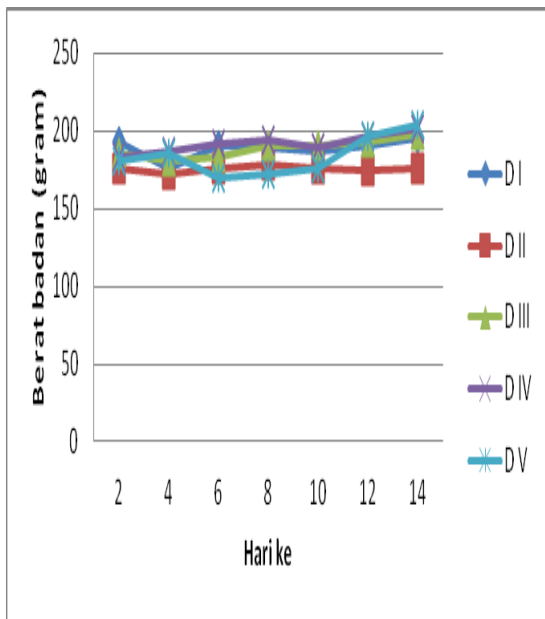
dan kreatinin menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Hasil dan Pembahasan

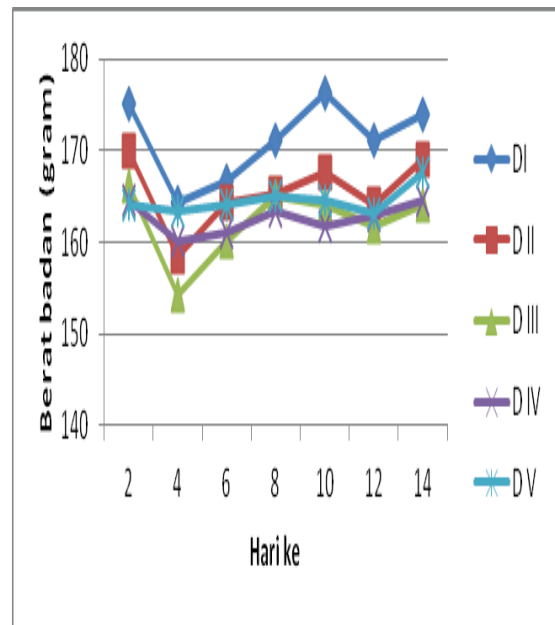
Uji toksisitas akut

Pengamatan selama 6 jam setelah pemberian ekstrak terhadap aktivitas tikus (aktivitas spontan, peka sentuhan, rasa nyeri) dan eksitasi sistem saraf pusat (gejala straub, melompat, tremor, dan konvulsi) menunjukkan tidak terlihat gejala-gejala tersebut di atas. Semua tikus terlihat normal baik pada semua kelompok dosis.

Penimbangan berat badan tikus jantan dan betina yang merupakan selisih penimbangan berat badan setiap 2 hari selama pengamatan 14 hari disajikan pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Rerata perubahan berat badan selama 14 hari pada tikus jantan



Gambar 2. Rerata perubahan berat badan selama 14 hari pada tikus betina

Terdapat perbedaan pola perubahan berat badan antara tikus jantan dan tikus betina. Tikus betina mempunyai fluktuasi perubahan yang mirip, yaitu turun dan naik. Sementara tikus jantan terdapat kenaikan yang cukup konstan.

Perhitungan LD₅₀ formula ekstrak biji klabet dan daun kelor (1:1) pada tikus putih menghasilkan harga LD₅₀ semu > 4.000 mg/200g bb, sehingga campuran bahan tersebut termasuk dalam golongan bahan *practically non toxic* (PNT). Hal ini karena dosis terbesar pada kelompok di atas (20.000 mg/kg bb) >15.000 mg/kg bb.

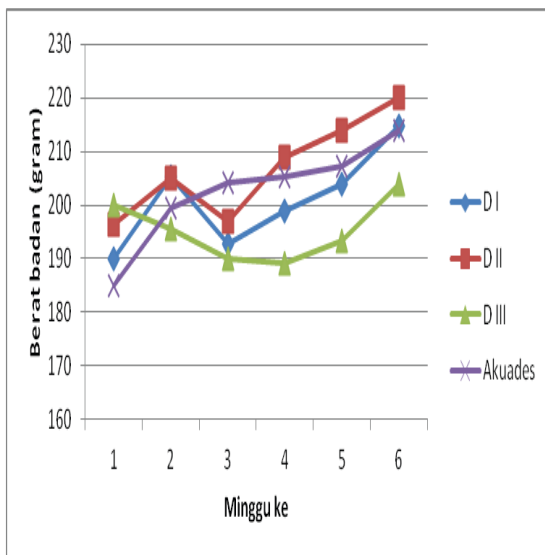
Biji klabet dan daun kelor sehari-hari merupakan makanan yang biasa digunakan oleh masyarakat. Dengan dasar pertimbangan tersebut, penulis beranggapan bahwa kedua simplisia tersebut sangat aman. Adanya upaya membuat suatu ramuan dengan formula ekstrak biji klabet dan ekstrak daun kelor (1:1) untuk pelancar ASI dan peningkat gizi, merupakan dasar mengapa sangat diperlukan uji toksisitas ramuan tersebut. Analisis fitokimia dari

klabet dan kelor menunjukkan adanya fenol, alkaloid, saponin, steroid, alkaloid dan flavonoid (dalam biji klabet)^{14,15}. Kemungkinan terjadinya interaksi antara komponen dalam masing-masing ekstrak dapat terjadi sehingga menimbulkan ke-toksikan.¹⁶

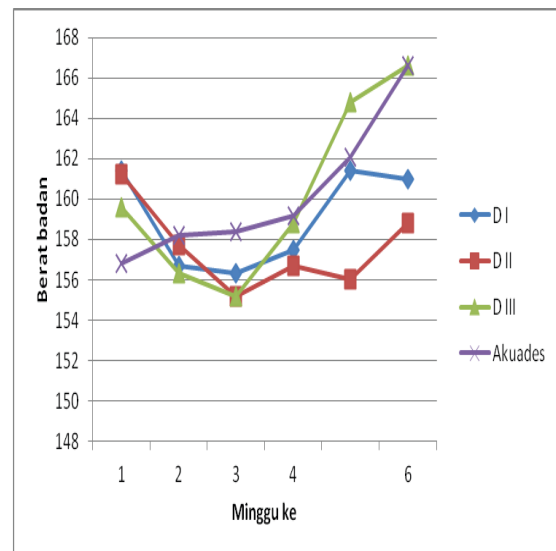
Pada uji dosis toksisitas yaitu akut, pemberian ramuan dengan dosis terbesar, yaitu 4000 mg/200g bb tidak menimbulkan efek toksik berupa kematian atau kelainan perilaku tikus, dan didapatkan LD₅₀ semu >20.000 mg/kg bb. Artinya, jika seseorang mengkonsumsi ramuan ekstrak daun kelor dan biji klabet (1:1) hingga diatas 2 g/ kg bb tubuh, akan aman.

Uji toksisitas sub kronis

Dari pemberian bahan uji selama 6 minggu (45 hari), terlihat pola penurunan berat badan sampai minggu ke-3, dan kemudian naik kembali hingga minggu ke-6. Hal tersebut berlaku untuk kelompok jantan maupun betina, dan dapat dilihat dalam Gambar 3 dan 4.



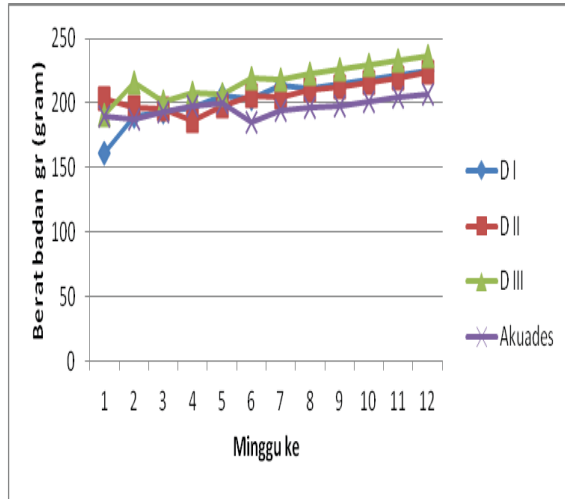
Gambar 3. Rerata perubahan berat badan selama 6 minggu pada tikus jantan



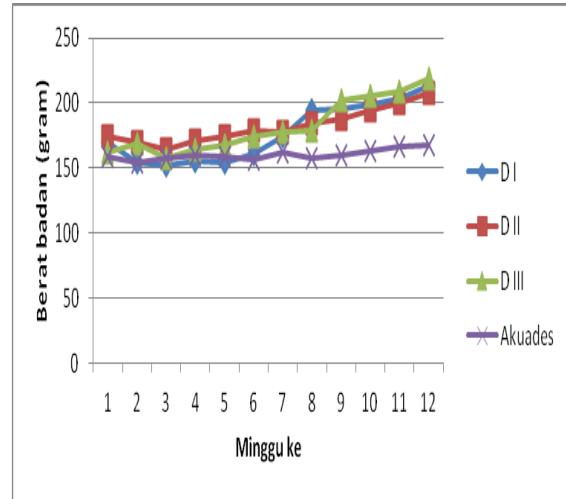
Gambar 4. Rerata perubahan berat badan selama 6 minggu pada tikus betina

Pada Pengukuran berat badan selama 12 minggu pemberian bahan uji, pola penurunan berat badan terjadi sampai minggu ke 3, dan kemudian naik kembali hingga minggu ke 6. Hal tersebut berlaku

untuk kelompok jantan maupun betina. Kejadian tersebut hampir sama dengan pemberian bahan uji 6 minggu. Hal ini dapat dilihat dalam Gambar 5 dan 6.



Gambar 5. Rerata perubahan berat badan selama 12 minggu pada tikus jantan



Gambar 6. Rerata perubahan berat badan selama 12 minggu pada tikus betina

Tabel 1. Rerata hasil pengukuran gambaran darah dan biokimia darah pada serum 5 ekor tikus jantan selama 45 hari pemberian bahan uji

Pengukuran	Kelompok Perlakuan			
	Ekstrak ramuan 30 mg/200g bb	Ekstrak ramuan 100mg/200g bb	Ekstrak ramuan 300 mg/200g bb	Akuades 2 mL/200g bb
Sel darah merah (x 10 ⁶)	8,78 ± 0,56 ^a	8,35 ± 0,56 ^a	7,85 ± 0,56 ^a	7,47 ± 0,92 ^a
Sel darah putih (x 10 ³)	18 ± 5,77 ^a	21,72 ± 8,11 ^a	18,1 ± 5,86 ^a	10,44 ± 1,33 ^b
Hb (mg/dL)	14,06 ± 0,49 ^a	13,92 ± 0,39 ^a	13,96 ± 0,53 ^a	13,70 ± 0,64 ^a
SGPT (UI/L)	71,1 ± 13,58 ^a	81,43 ± 11,13 ^a	66,2 ± 5,20 ^b	62,26 ± 6,36 ^b
SGOT (UI/L)	139,28 ± 31,34 ^a	146 ± 20,37 ^a	138,26 ± 20,05 ^a	146,24 ± 11,89 ^a
Ureum (mg/dL)	45,19 ± 5,36 ^a	44,65 ± 5,92 ^a	41,18 ± 12,46 ^a	45,50 ± 10,63 ^a
Kreatinin (mg/dL)	0,69 ± 0,11 ^a	0,76 ± 0,08 ^a	0,78 ± 0,14 ^a	0,66 ± 0,08 ^a

Ket : huruf yang sama pada kolom yang berbeda tidak berbeda nyata (p>0,05)

Tabel 2. Rerata hasil pengukuran gambaran darah dan biokimia darah pada serum 5 ekor tikus betina selama 45 hari pemberian bahan uji

Pengukuran	Kelompok Perlakuan			
	Ekstrak ramuan 30 mg/200g bb	Ekstrak ramuan 100mg/200bb	Ekstrak ramuan 300mg/200g bb	Akuades 2ml/200g bb
Sel darah merah ($\times 10^6$)	6,95 \pm 0,25 ^a	7,14 \pm 0,37 ^a	7,098 \pm 0,36 ^a	6,99 \pm 0,53 ^a
Sel darah merah (10^3)	14,72 \pm 1,96^a	15,92 \pm 4,53^a	20,98 \pm 6,01^a	8,28 \pm 1,06^b
Hb (mg/dL)	12,84 \pm 0,64 ^a	13,27 \pm 0,53 ^a	13,06 \pm 0,54 ^a	13,38 \pm 8,26 ^a
SGPT (UI/L)	67,45 \pm 14,07^a	67,01 \pm 9,80^a	75,23 \pm 5,98^a	57,59 \pm 8,26^b
SGOT (UI/L)	124,32 \pm 6,93 ^b	137,62 \pm 30,87 ^a	156,18 \pm 19,35 ^a	153,04 \pm 8,13 ^a
Ureum (mg/dL)	43,74 \pm 3,74 ^a	74,39 \pm 9,26 ^b	45,26 \pm 6,20 ^a	40,37 \pm 13,01 ^a
Kreatinin (mg/dL)	0,77 \pm 0,10 ^a	0,91 \pm 0,08 ^a	0,87 \pm 0,11 ^a	0,55 \pm 0,07 ^b

Ket : huruf yang sama pada kolom yang berbeda tidak berbeda nyata ($p > 0,05$)

Pengukuran gambaran darah dan biokimia darah

Terjadi peningkatan sel darah putih pada ketiga kelompok dosis dan peningkatan SGPT pada kelompok dosis 30 dan 100 mg/200g bb ($p < 0,05$).

Terjadi peningkatan jumlah sel darah putih dibandingkan kelompok akuades, demikian juga adanya peningkatan SGPT dibandingkan kelompok akuades, peningkatan kadar ureum pada kelompok dosis 100 mg/200g bb, serta peningkatan kadar kreatinin pada ketiga kelompok dosis .

Tikus jantan yang diberi ramuan ekstrak daun kelor dan biji klabet selama 6 minggu (45 hari) menunjukkan peningkatan berat badan walaupun terlihat ada fluktuasi. Demikian juga dengan kenaikan kelompok akuades, walaupun kenaikan yang terjadi kurang berarti dan fluktuatif. Secara fisik, terdapat tikus yang mengalami bisul di badannya (Gambar 7). Munculnya bisul kemungkinan karena adanya protein tinggi pada bahan yang diuji. Diketahui kandungan protein pada daun kelor adalah 27,1 g/100g daun kelor kering¹⁷ dan

kandungan protein yang tinggi dapat menyebabkan tikus hiperproteinemia sehingga menyebabkan munculnya bisul. Disamping karena tingginya kandungan protein dalam kelor, terdapat kandungan asam amino (sebagai penyusun protein) yang tinggi pada ekstrak biji klabet. Tingginya kadar protein dari daun kelor dan biji klabet dapat menyebabkan munculnya bisul, dan infeksi bisul menyebabkan peningkatan jumlah sel darah putih. Sel darah putih pada kelompok tikus jantan dan betina berbeda nyata pada dosis 30 mg/200g bb ($p < 0,05$).

Pada tikus jantan dan betina, terjadi juga peningkatan kadar SGPT dibandingkan kelompok akuades secara signifikan ($p < 0,05$). Hal ini sebanding juga dengan hasil pemeriksaan histopatologi pada organ hati yang menunjukkan adanya kelainan polimorfonuklear dan dilatasi sinusoid hepatic nekrosis. Kelainan lain adalah adanya kenaikan kadar kreatinin pada dosis 100 mg/200 g bb, didukung pula dengan sebanyak 80 % (2 TKS dari $n=10$) organ ginjal mengalami kelainan berupa terjadi nekrosis tubulus proksimalis dan infiltrasi sel neutrofil dengan indikasi nefritis.^{18,19}

Adanya kelainan pada organ hati, ginjal dan peningkatan jumlah sel darah putih menunjukkan bahwa ramuan menimbulkan ketoksikan. Adapun hasil penguku-

ran gambaran darah dan biokimia darah pada serum 5 ekor tikus jantan dan betina selama 90 hari pemberian bahan uji dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Tabel 3. Rerata hasil pengukuran gambaran darah dan biokimia darah pada serum 5 ekor tikus jantan selama 90 hari pemberian bahan uji

Pengukuran	Kelompok Perlakuan			
	Ekstrak ramuan 30 mg/200g bb	Ekstrak ramuan 100mg/200bb	Ekstrak ramuan 300mg/200g bb	Akuades 2ml/200g bb
Sel darah merah ($\times 10^6$)	7,95 \pm 1,09 ^a	8,20 \pm 0,46 ^a	8,11 \pm 0,49 ^a	7,84 \pm 0,85 ^a
Sel darah putih (10^3)	25,56 \pm 7,67^a	18,92 \pm 6,03 ^b	15,14 \pm 4,37 ^b	11,70 \pm 1,32^b
Hb (mg/dL)	13,82 \pm 0,31 ^a	13,98 \pm 0,42 ^a	13,60 \pm 0,80 ^a	14,31 \pm 1,22 ^a
SGPT (UI/L)	60,73 \pm 5,90 ^a	64,81 \pm 2,72 ^{ab}	61,23 \pm 8,22 ^{ab}	62,90 \pm 3,98 ^b
SGOT (UI/L)	158,88 \pm 28,53 ^a	147,68 \pm 37,21 ^a	161,44 \pm 24,72 ^a	130,02 \pm 17,90 ^a
Ureum (mg/dL)	31,35 \pm 2,01 ^a	34,36 \pm 7,71 ^b	26,09 \pm 3,61 ^a	31,16 \pm 3,54 ^a
Kreatinin (mg/dL)	0,73 \pm 0,15 ^a	0,90 \pm 0,14^b	1,00 \pm 0,13^b	0,78 \pm 0,10^a

Ket : huruf yang sama pada kolom yang berbeda tidak berbeda nyata ($p > 0,05$)

Tabel 4. Rerata hasil pengukuran gambaran darah dan biokimia darah pada serum 5 ekor tikus betina selama 90 hari pemberian bahan uji

Pengukuran	Kelompok Perlakuan			
	Ekstrak ramuan 30 mg/200g bb	Ekstrak ramuan 100mg/200bb	Ekstrak ramuan 300mg/200g bb	Akuades 2ml/200g bb
Sel darah merah ($\times 10^6$)	7,59 \pm 0,16 ^a	6,95 \pm 0,59 ^a	6,65 \pm 0,71 ^a	7,84 \pm 0,853 ^a
Sel darah merah (10^3)	16,06 \pm 7,86^a	10,22 \pm 2,84 ^a	14,02 \pm 2,84 ^b	11,30 \pm 4,92^b
Hb (mg/dL)	13,02 \pm 0,93 ^a	13,20 \pm 0,70 ^a	13,08 \pm 1,39 ^a	13,50 \pm 1,22 ^a
SGPT (UI/L)	68,61 \pm 11,33 ^a	53,88 \pm 5,44 ^a	61,88 \pm 7,40 ^a	51,49 \pm 9,10 ^a
SGOT (UI/L)	135,77 \pm 24,73 ^a	132,78 \pm 18,21 ^a	133,38 \pm 20,57 ^a	157,77 \pm 13,10 ^a
Ureum (mg/dL)	34,49 \pm 6,37 ^a	26,94 \pm 3,12 ^a	29,43 \pm 5,38 ^a	33,29 \pm 11,54 ^a
Kreatinin (mg/dL)	0,82 \pm 0,07 ^a	0,97 \pm 0,20^b	0,81 \pm 0,09 ^a	0,79 \pm 0,05^a

Ket : huruf yang sama pada kolom yang berbeda tidak berbeda nyata ($p > 0,05$)

Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa pada tikus jantan terjadi peningkatan jumlah sel darah putih pada kelompok dosis 30 mg/200g bb. serta adanya peningkatan kadar kreatinin pada dosis 100 dan 300 mg/200 g bb. Sementara itu, hasil uji pada tikus betina yang disajikan pada Tabel 4 menunjukkan terjadinya peningkatan jumlah sel darah putih pada dosis 30 mg/200g bb serta peningkatan kadar kreatinin pada kelompok dosis 100 mg/200 g bb.

Pengamatan masa *recovery*.^{11,12}

Pemeriksaan gambaran darah, biokimia darah dan histopatologi dilakukan pada kelompok akuades dan kelompok ekstrak ramuan dosis 300 mg/200g bb selama 90 hari, kemudian hewan uji didiamkan 14 hari tanpa perlakuan. Pemeriksaan ini dilakukan untuk mengetahui keadaan masa *recovery*.

Tabel 5. Rerata hasil pengukuran gambaran darah dan biokimia darah pada serum setelah masa *recovery* pada tikus jantan dan betina

Pengukuran	Kelompok Perlakuan			
	Ekstrak ramuan 30 mg/200g bb	Ekstrak ramuan 100mg/200bb	Ekstrak ramuan 300mg/200g bb	Akuades 2ml/200g bb
Sel darah merah ($\times 10^6$)	10,69 \pm 1,36 ^b	7,84 \pm 0,85 ^a	7,65 \pm 0,71 ^a	7,84 \pm 0,853 ^a
Sel darah merah ($\times 10^3$)	17,36 \pm 9,27 ^a	11,70 \pm 1,32 ^b	8,10 \pm 0,95 ^b	11,30 \pm 4,92 ^b
Hb (mg/dL)	16,44 \pm 0,25 ^a	14,31 \pm 1,22 ^a	14,12 \pm 1,68 ^b	13,50 \pm 1,22 ^a
SGPT (UI/L)	57,25 \pm 4,22 ^a	62,90 \pm 3,98 ^a	61,23 \pm 5,22 ^a	51,49 \pm 9,10 ^a
SGOT (UI/L)	130,02 \pm 17,90 ^b	162,67 \pm 18,93 ^a	117,30 \pm 9,39 ^b	157,77 \pm 13,10 ^a
Ureum (mg/dL)	28,13 \pm 3,02 ^a	31,16 \pm 3,54 ^b	28,45 \pm 3,17 ^a	33,29 \pm 11,54 ^a
Kreatinin (mg/dL)	0,86 \pm 0,09 ^a	0,78 \pm 0,10 ^a	0,76 \pm 0,06 ^a	0,79 \pm 0,05 ^b

Ket : huruf yang sama pada kolom yang berbeda tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Tabel 6. Kelainan organ (jantung, paru-paru, ginjal dan hati) tikus jantan dan betina serta organ (uterus dan ovarium) tikus betina setelah pemberian bahan uji 45 hari.

No	Kelompok	Kelainan organ dari 10 tikus						
		Jantung (n=10)	Paru (n=10)	Ginjal (n=10)	Hati (n=10)	Lambung (n=10)	Uterus (n=5)	Ovarium (n = 5)
1.	Ekstrak ramuan 30 mg/200g bb	10 TKS	5 TKS	2 TKS	9 TKS	4 TKS	0 TKS	0 TKS
2.	Ekstrak ramuan 100 mg/200g bb	10 TKS	1 TKS	4 TKS	8 TKS	5 TKS	3 TKS	3 TKS
3.	Ekstrak ramuan 300 mg/200g bb	10 TKS	0 TKS	3 TKS	3 TKS	5 TKS	0 TKS	3 TKS
4.	Akuades 2mL/200g bb	10 TKS	10 TKS	9 TKS	10 TKS	10 TKS	4 TKS	4TKS

TKS : Tidak terjadi kelainan spesifik

Setelah masa *recovery*, terlihat bahwa pada tikus jantan nilai sel darah merah meningkat, namun sel darah putih tetap tinggi di atas kelompok akuades. Berbeda dengan tikus betina yang terjadi penurunan jumlah sel darah putih.

Histopatologi ⁽¹³⁾

Hasil pemeriksaan mikroskopis terhadap organ (jantung, paru, ginjal, hati, lambung) dari tikus percobaan yang diberi

akuades (K-) dan tikus percobaan yang diberi ekstrak ramuan 30 mg/200g bb; 100 mg/200g bb dan 300 mg/200 g bb selama 45 hari dan 90 hari dapat dilihat pada Tabel 6 dan Tabel 7.

Pada pemberian bahan uji 5 hari, kelainan spesifik diatas 50% terjadi pada ginjal, hati (dosis 300 mg/200g bb), uterus (dosis 30 dan 300 g/200g bb) serta pada ovarium (dosis 30 mg/200g bb).

Tabel 7. Kelainan organ (jantung, paru-paru, ginjal, hati dan lambung) tikus jantan dan betina serta organ (uterus dan ovarium) tikus betina setelah pemberian bahan uji 90 hari

No	Kelompok	Kelainan organ dari 10 tikus						
		Jantung (n=10)	Paru (n=10)	Ginjal (n=10)	Hati (n=10)	Lambung (n=10)	Uterus (n=5)	Ovarium (n=5)
1.	Ekstrak ramuan 30 mg/200g bb	10 TKS	8 TKS	4 TKS	9 TKS	2 TKS	2 TKS	3 TKS
2.	Ekstrak ramuan 100 mg/200g bb	10 TKS	7 TKS	2 TKS	10 TKS	2 TKS	1 TKS	5 TKS
3.	Ekstrak ramuan 300 mg/200g bb	10 TKS	8 TKS	5 TKS	6 TKS	4 TKS	4 TKS	5 TKS
4.	Akuades 2 mL/200g bb	10 TKS	10 TKS	9 TKS	10 TKS	9 TKS	4 TKS	4 TKS
Masa <i>recovery</i>								
5.	Ekstrak ramuan 300 mg/200g bb	10 TKS	9 TKS	3 TKS	10 TKS	4 TKS	3 TKS	5 TKS

TKS : Tidak terjadi kelainan spesifik



Gambar 7. Gambaran munculnya kelainan fisik berupa bisul pada tikus

Pada pemberian bahan uji selama 90 hari, kelainan spesifik lebih dari 50% terjadi pada ginjal (dosis 30 dan 100 mg/200g bb), dan uterus (dosis 30 dan 100 mg/200g bb).

Setelah masa *recovery*, pada organ hati terjadi perbaikan, namun pada organ lain seperti ginjal, lambung dan uterus, tidak ada perubahan gambaran histopatologinya.

Sementara itu, kelainan fisik berupa bisul pada beberapa ekor tikus jantan dan betina dapat dilihat pada Gambar 7.

Uji toksisitas subkronis pada pemberian bahan uji selama 90 hari pada tikus jantan dan betina menunjukkan perbedaan bermakna jumlah sel darah putih pada dosis 30 mg/200g bb, baik pada tikus jantan maupun betina, walaupun pada dosis yang lebih besar tidak terjadi perbedaan dengan kelompok akuades ($p>0,05$) artinya, kelainan ini tidak berbeda dengan kasus yang terjadi pada pemberian 45 hari, termasuk adanya kelainan fisik timbulnya bisul pada beberapa tikus. Selain itu, terjadi peningkatan kadar kreatinin pada dosis 100 mg/200g bb dan 300 mg/200g bb. Hal lain yang perlu diperhatikan adalah meningkatnya SGPT, namun untuk membahas hal ini lebih lanjut, data perlu dikaitkan dengan hasil uji histopatologi.

Organ yang mengalami kelainan adalah ginjal, lambung dan uterus (TKS>50%). Pada ginjal, kelainan spesifik adalah nekrosis tubulus proksimalis dan infiltrasi sel neutrofil dengan indikasi terjadinya nefritis. Kelainan pada lambung dengan indikasi gastritis dapat disebabkan oleh adanya infiltrasi sel neutrofil pada submukosa, dan kelainan pada uterus disebabkan oleh adanya infiltrasi sel neutrofil dengan indikasi terjadi endometritis.^{18,19} Penelitian yang sama dilakukan pada biji klabet, pemberian 90 hari terus menerus, tidak menunjukkan efek toksik, dibuktikan dengan fungsi hati dan hasil histopatologi serta pengukuran parameter hematologi.¹⁶

Sementara itu uji toksisitas dengan pemberian terus menerus selama 30 hari pada ekstrak air menunjukkan adanya sedikit efek toksik, namun pada ekstrak etanol tidak menunjukkan adanya sifat toksik²⁰. Kelainan pada uterus, dapat didukung berdasarkan hasil penelitian yang menyatakan bahwa pada uji toksisitas ekstrak air biji kelor terjadi efek toksik pada organ reproduksi dan menyebabkan adanya efek teratogenik.²¹

Walaupun daun kelor dan biji klabet merupakan tanaman obat yang sudah digunakan sehari-hari sebagai suplemen yang bahkan sudah beredar dalam bentuk produk, kombinasi dari ekstrak daun kelor dan biji klabet jika digunakan dalam jangka panjang ternyata menyebabkan efek toksik. Dugaan penyebabnya adalah tingginya kadar kandungan komponen masing-masing ekstrak biji klabet dan daun kelor yang dapat menyebabkan adanya interaksi atau kadar protein menjadi terlalu tinggi sehingga menyebabkan timbulnya kelainan fisik pada hewan uji. Untuk membuktikan hal tersebut, diperlukan analisis lebih dalam.

Kesimpulan dan Saran

1. Pemeriksaan toksisitas akut ramuan dengan formula ekstrak biji klabet dan daun kelor (1:1) menunjukkan bahwa hingga pemberian dosis 4000 mg/200g bb atau 20.000 mg /kg bb tidak menimbulkan kelainan dan kematian
2. Ramuan dengan formula ekstrak biji klabet dan daun kelor (1:1) yang diberikan setiap hari selama 1,5 bulan dan 3 bulan terus menerus menunjukkan ketoksikan dengan meningkatnya jumlah sel darah putih dan secara fisik menunjukkan adanya bisul pada beberapa hewan uji. Ketoksikan lain adalah pada fungsi hati dan ginjal serta lambung.
3. Ramuan dengan formula ekstrak biji klabet dan daun kelor (1:1) yang diberikan setiap hari selama 1,5 bulan -

dan 3 bulan terus menerus menimbulkan ketoksikan pada uterus dengan indikasi adanya endometriosis.

Dari hasil pengujian, tidak direkomendasikan pengembangan ramuan kombinasi ekstrak biji klabet dan daun kelor menjadi 1 formula. Akan tetapi, pengembangan secara tunggal sebagai pelancar ASI dan penambah gizi untuk ibu menyusui tetap dapat digunakan, namun tetap diperhatikan penggunaannya dalam jangka panjang.

Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, teman tim peneliti serta pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini, serta Balai Penelitian Veteriner, Bogor.

Daftar Rujukan

- Soeparmanto P, Pranata S. Faktor-faktor yang mempengaruhi pemberian Air Susu Ibu (ASI) eksklusif pada bayi. *Buletin Penelitian Sistem Kesehatan*. 2005; 8(1): 1-7.
- Prawirosudirdjo. A survey of breast practices among mothers of highly selected group in Jakarta. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 1984;14: 198-207.
- Moecherdiyantiningsih, Komala, Muhilal. Khasiat jamu melahirkan terhadap kenaikan produksi air susu ibu. *Jurnal penelitian Gizi dan Makanan* 1995; 18.
- Wirahardja T, Mulyono MW. Halba *Trigonella foenum-graecum* L., tumbuhan potensial untuk obat dan industri farmasi. *Prosiding I Seminar Pembudidayaan Tanaman Obat*. 1985; 295-298.
- Wiryowidagdo, S. Kimia dan farmakologi bahan alam. *Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional*; 2000.
- Sawford S, Berens, B. Effect of fenugreek on breast milk production. *ABM News and Views, annual meeting abstracts*. 2000; 6(3): 11-13.
- Djaiman SPH, Sihadi. Besarnya peluang usia penyapihan baduta di Indonesia dan faktor yang mempengaruhinya. *Media Litbang Kesehatan*. 2009; 19(1).
- Depkes RI. *Panduan 13 pesan dasar gizi bayi dan balita*. Jakarta: Bhratara; 1992.
- Anonim. *Parameter Umum EkstrakTumbuhan Obat Edisi I*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2000.
- Indonesia volume 2. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan RI; 2006.
- Prosedur operasional baku uji toksisitas. Jakarta: Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan; 1991.
- Organization For Economic Cooperation and Development. *The OECD principles of good laboratory practice*. Paris: Organization For Economic Cooperation and Development; 1992.
- Leeson CR, Leeson TS, Paparo AA. *Buku ajar histologi*. (Terj. dari Textbook of histology) Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran; 1990.
- Alegantina S, Isnawati A, Widowati L. Kualitas ekstrak etanol 70% daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) dalam ramuan penambah ASI. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 2013; 2(1).
- Isnawati A, Alegantina S, Widowati L. Karakterisasi ekstrak etanol biji klabet (*Trigonella foenum-graecum* L.) sebagai tanaman obat pelancar ASI. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 2013; 41(2).
- Ogbonnia SO, Glayemi SO, Anyika EN, Enwuru VN, Poluyi OO. Evaluation of acute toxicity in mice and subchronic toxicity of hydroethanolic extract of *Parinari curatellifolia* Planch (Chrysobalanaceae) seeds in rats. *African Journal of Biotechnology*. 2009; 8(9): 1800-1806.
- Fuglie, LJ. *The Moringa Tree, a local solution for malnutrition*. Dagar: Church World Service; 2003.
- Robbins SL, Kumar V. *Patologi I*. (Terj. dari Basic Pathology) Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran; 1992.
- Toppo FA, Akhand R, Pathak AK. Pharmacological actions and potential uses of *Trigonella foenum-graecum*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2009; 2(4).
- Kasolo JN Bimenya GS, Ojok L, Ogwal-Okeng JW. Sub-acute toxicity evaluation of *Moringa oleifera* leaves aqueous and ethanol extracts in swiss albino rats. *Kampala. School of Veterinary Medicine, Makerere University*. 2012.
- Hakim J. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lamk. (Moringaceae). *Jurnal Ethnopharmacology*. 2012; 139 (2): 330-6.