

# TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOLIK BIJI BUAH PINANG (*Areca catechu* L.) TERHADAP TIKUS JANTAN GALUR SPRAGUE DAWLEY

Sri Handayani<sup>1</sup>, Edy Meiyanto<sup>2\*</sup>, Riris Istighfari Jenie<sup>2</sup>, dan Ratna Asmah Susidarti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

<sup>2</sup>Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC),

Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

\* Korespondensi : Dr Edy Meiyanto, M.Si., Apt. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Sekip Utara Yogyakarta, 55281. Telp. 0274-543120. E-mail: [meiyan\\_e@ugm.ac.id](mailto:meiyan_e@ugm.ac.id)

## ABSTRAK

Ekstrak etanolik biji buah pinang (*Areca catechu* L.) memperlihatkan aktivitas penghambatan proliferasi sel kanker payudara T47D dan MCF-7. Tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* usia 8 minggu dibagi dalam lima kelompok, yaitu empat kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol pelarut CMC-Na 5%. Pemejanaan dosis tunggal peroral dilakukan terhadap subjek uji dengan variasi dosis ekstrak etanolik biji pinang mulai dari dosis yang paling aman hingga dosis tertinggi yang diharapkan toksik pada semua hewan uji (0,1; 0,72; 5,36 dan 10 gram/kg berat badan). Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap gejala-gejala toksik, wujud dan mekanisme efek toksik maupun patologi organ vital. Pengamatan mikroskopis berupa histopatologi beberapa organ vital dilakukan dengan pengecatan *Hematoxillen&Eosin* (H&E). Hasil uji menunjukkan bahwa semua kelompok dosis perlakuan tidak mengalami gejala toksik, sama halnya dengan kelompok kontrol. Pemberian dosis tunggal ekstrak etanolik biji pinang tidak menimbulkan kematian pada subjek uji, bahkan pada dosis tertinggi sekalipun. Oleh karena itu pengamatan dilanjutkan hingga 14 hari. Pada hari ke-15 dilakukan pembedahan pada semua subjek uji. Pengamatan mikroskopis menunjukkan tidak ada perubahan histopatologis yang berarti pada seluruh kelompok perlakuan. Hasil uji ini menambah dasar keamanan penggunaan ekstrak etanolik biji pinang dalam pengembangannya sebagai agen terapi alternatif.

**Kata kunci:** Ekstrak etanolik, *Areca catechu*, toksisitas akut, tikus

## ABSTRACT

*Areca (Areca catechu L.) seeds ethanolic extract inhibits proliferation activity on T47D and MCF-7 breast cancer cell lines. Male Sprague Dawley Rat (Rattus norvegicus) age 8 weeks divided into five groups, four groups of treatment and one group of 0.5%CMC-NA solvent control. Single dose peroral application is done to test subject with various dose of areca seeds ethanolic extract starts from dose that is most finite safe of highest dose expected is toxic at all of test animal ( 0.1; 0.72; 5.36 and 10 gram/kg body weight). Observation is done during 24 hours to toxic symptoms, mechanism of vital toxic effect and also pathology of vital organ. Microscopic observation in the form of histopathology some vital organs is done with Hematoxillen&Eosin ( H&E) coloration. The result showed that toxic effect did not appear either on treatment groups or control group. Treatment of single dose of areca ethanolic extract, even in highest dose, did not cause the death of test animal. Therefore, observation extended to 14 days and terminated. The microscopic observation showed that all of groups did not show histopathologic changes. The result increase safety of areca ethanolic extract on its development as herbal drug.*

**Key words:** ethanolic extract, *Areca catechu*, acute toxicity, rat.

## PENDAHULUAN

Toksisitas akut adalah derajat efek toksik suatu senyawa pada hewan uji tertentu, yang terjadi dalam waktu singkat setelah pemberiannya pada dosis tunggal. Potensi toksisitas pada uji toksisitas akut ditentukan dengan parameter "lethal dose" 50% (LD<sub>50</sub>), yaitu suatu tolok ukur kuantitatif yang menyatakan kisaran dosis letal atau toksik<sup>(1)</sup>.

*Areca catechu* L. merupakan tanaman famili *Arecaceae* yang berpotensi sebagai antikanker karena memiliki efek antioksidan, dan antimutagenik<sup>(2,3)</sup>. Biji buah pinang mengandung alkaloid, seperti Arekolin (C<sub>8</sub> H<sub>13</sub> NO<sub>2</sub>), arekolidine, arekain, guvakolin, guvasine dan isoguvasine. Biji buah pinang mengandung proantosianidin, yaitu suatu tanin terkondensasi yang termasuk dalam golongan flavonoid<sup>(4)</sup>. Proantosianidin mempunyai efek antibakteri, antivirus, antikarsinogenik, anti-inflamasi, anti-alergi, dan vasodilatasi<sup>(5)</sup>. Ekstrak etanolik biji buah pinang mengandung tanin terkondensasi, tanin terhidrolisis, flavan, dan senyawa fenolik, asam galat, getah, lignin, minyak menguap dan tidak menguap, serta garam<sup>(2)</sup>. Berdasarkan penelitian terdahulu, ekstrak etanolik biji buah pinang (*Areca catechu* L.) memperlihatkan aktivitas penghambatan proliferasi sel kanker payudara T47D dan MCF-7 masing-masing dengan IC<sub>50</sub> sebesar 60 dan 77 µg/ml, mampu menginduksi apoptosis, yaitu suatu mekanisme bunuh diri sel secara terprogram yang dilakukan apabila sel tersebut mengalami abnormalitas<sup>(6-9)</sup>. Selain itu, ekstrak etanolik biji buah pinang juga berpotensi sinergis apabila dikombinasi dengan agen kemoterapi<sup>(10,11)</sup>. Oleh karena itu, ekstrak ini diharapkan mempunyai efek farmakologi yang maksimum dan toksisitas yang kecil.

Dalam penelitian ini dilakukan uji toksisitas akut dari ekstrak etanolik biji buah pinang untuk mendeteksi efek toksik akut sehingga dapat diperoleh gambaran keamanannya pada tikus normal secara *in vivo*.

## BAHAN DAN METODA

### Subyek uji

Pada penelitian ini digunakan satu jenis hewan uji yaitu tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* normal dan sehat, umur 8 minggu, dengan bobot badan 130-160 gram.

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak biji buah pinang yang simplisianya diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat

Tradisional (B2P2TOOT) Karanganyar, *Natrium Carboxymethyl Cellulose* (CMC-Na) (Merck), akuades, NaCl, formalin teknis 10 %.

### **Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spuit injeksi, jarum oral, neraca analitik, timbangan tikus, mortir dan stamper, stirer yang dilengkapi dengan pemanas, seperangkat alat gelas (gelas beker, gelas ukur, pipet, labu takar), kamera digital (Canon) dan seperangkat alat bedah (gunting, pinset, papan bedah, pot organ).

### **Metoda**

Sebanyak 30 ekor tikus jantan dibagi ke dalam lima kelompok, yaitu:

Kelompok I: kelompok ekstrak etanolik biji buah pinang dosis 0,1 g/kg BB

Kelompok II: kelompok ekstrak etanolik biji buah pinang dosis 0,72 g/kg BB

Kelompok III: kelompok ekstrak etanolik biji buah pinang dosis 5,36 g/kg BB

Kelompok IV: kelompok ekstrak etanolik biji buah pinang dosis 10 g/kg BB

Kelompok V: kelompok kontrol pelarut, diberi perlakuan pelarut CMC Na 0,5%

Pemberian sediaan uji dilakukan satu kali (*single dose*) secara peroral terhadap subjek uji.

### **Pengamatan Gejala Toksik**

Masa pengamatan dilakukan selama 24 jam setelah pemberian sediaan uji dan dilakukan secara intensif. Kriteria pengamatan meliputi pengamatan fisik, jumlah hewan yang mati dan pemeriksaan kondisi jaringan/organ dalam hubungannya dengan penyakit (histopatologi organ). Apabila tidak ada tikus yang mati dalam 24 jam, pengamatan dilanjutkan sampai dengan 14 hari kemudian.

### **Pemeriksaan Histopatologi**

Pada akhir pengamatan yaitu hari ke-15, setiap hewan uji dibedah, diambil jantung, hati, paru-paru, ginjal, lambung, dan usus. Organ-organ tersebut diamati secara makroskopis, kemudian ditimbang, dicuci dalam akuades, NaCl dan dimasukkan ke dalam pot yang berisi formalin 10 % untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan histopatologi. Semua parameter ini dibandingkan dengan kelompok pelarut (kelompok V).

### **Analisis Hasil**

Dalam penelitian ini dilakukan pengamatan terhadap perkembangan berat badan tikus baik kelompok perlakuan dan kontrol selama periode waktu penelitian. Analisis dilakukan dengan menghitung berat badan rata-rata tikus tiap kelompok. Analisis statistika signifikansi perubahan berat badan antar kelompok hewan uji menggunakan Anova dan dilanjutkan uji Tukey.

Potensi toksisitas ekstrak uji ditentukan dengan parameter "lethal dose" 50% (LD<sub>50</sub>) sebagai tolok ukur kuantitatif yang menyatakan kisaran dosis letal atau toksik sesuai dengan kategori pada Tabel I.

**Tabel 1.** Pengelompokan bahan kimia berdasarkan toksisitas relatifnya <sup>(1)</sup>.

<b>Kategori</b>	<b>LD<sub>50</sub> (mg/kg)</b>
Toksisitas sangat tinggi	≤ 1.0
Toksisitas tinggi	1.0 – 50
Toksisitas sedang	50 – 500
Agak toksik	500 – 5000
Praktis tidak toksik	5,000 – 15,000
Relatif tidak berbahaya	≥ 15,000

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pengamatan gejala-gejala toksik yang mungkin timbul diamati secara intensif pada 3 jam pertama, dan pengamatannya dilanjutkan hingga 24 jam. Gejala toksik yang diamati meliputi perubahan perilaku, gerakan menjilat, menggaruk, "kedutan", tremor, menggeliat, kereaktifan terhadap rangsang (keberangasan, kepasifan), refleks serebral dan spinal, ukuran pupil, sekresi, nafas, palpitasi kardiak, kulit, rambut, kematian. Hasil pengamatan kualitatif gejala toksik pada tikus jantan selama 24 jam setelah pemberian sediaan uji ekstrak etanolik biji buah pinang menunjukkan bahwa pada kelompok I, II dan V tidak terlihat adanya gejala toksik. Sedang pada kelompok dosis III dan IV beberapa hewan uji menunjukkan adanya perubahan perilaku berupa menggigit jari kaki belakang, kedutan, hiperaktif kemudian pasif, nafas tidak teratur dan berbunyi, bernafas tersengal-sengal, piloereksi, dan aritmia. Namun gejala membaik pada hari berikutnya (Tabel 2).

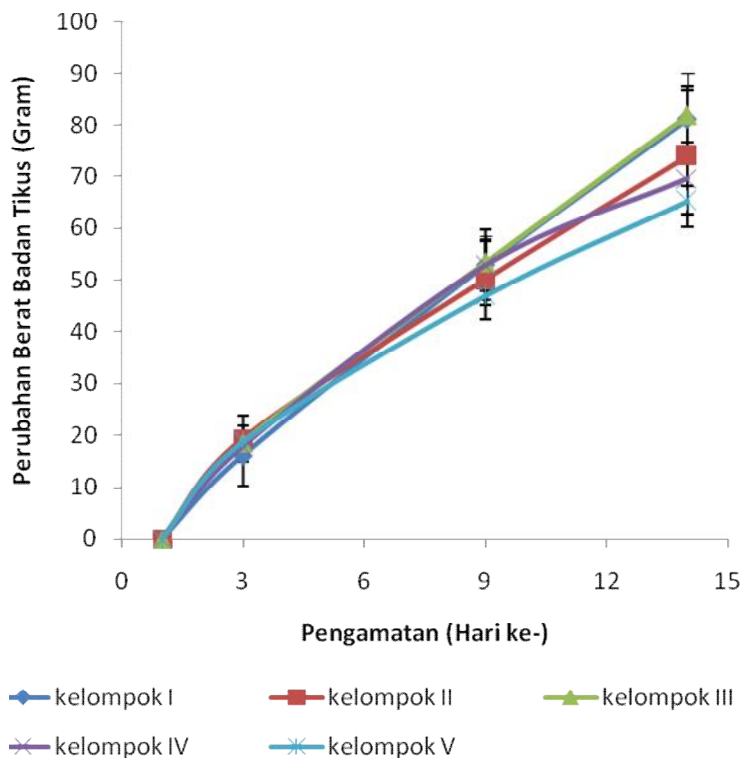
**Tabel 2.** Hasil pemeriksaan kualitatif gejala-gejala toksik tikus jantan selama 24 jam setelah pemberian peroral sediaan uji ekstrak etanolik biji buah pinang dosis tunggal

Kelompok	Perlakuan	N	Gejala Toksik
I	ekstrak dosis 0,1 g/kg BB	5	-
II	ekstrak dosis 0,72 g/kg BB	5	-
III	ekstrak dosis 5,36 g/kg BB	5	+
IV	ekstrak dosis 10 g/kg BB	5	+
V	larutan CMC Na 5%	5	-

Keterangan :

(-) : tidak ada gejala toksik ; (+) : ada gejala toksik

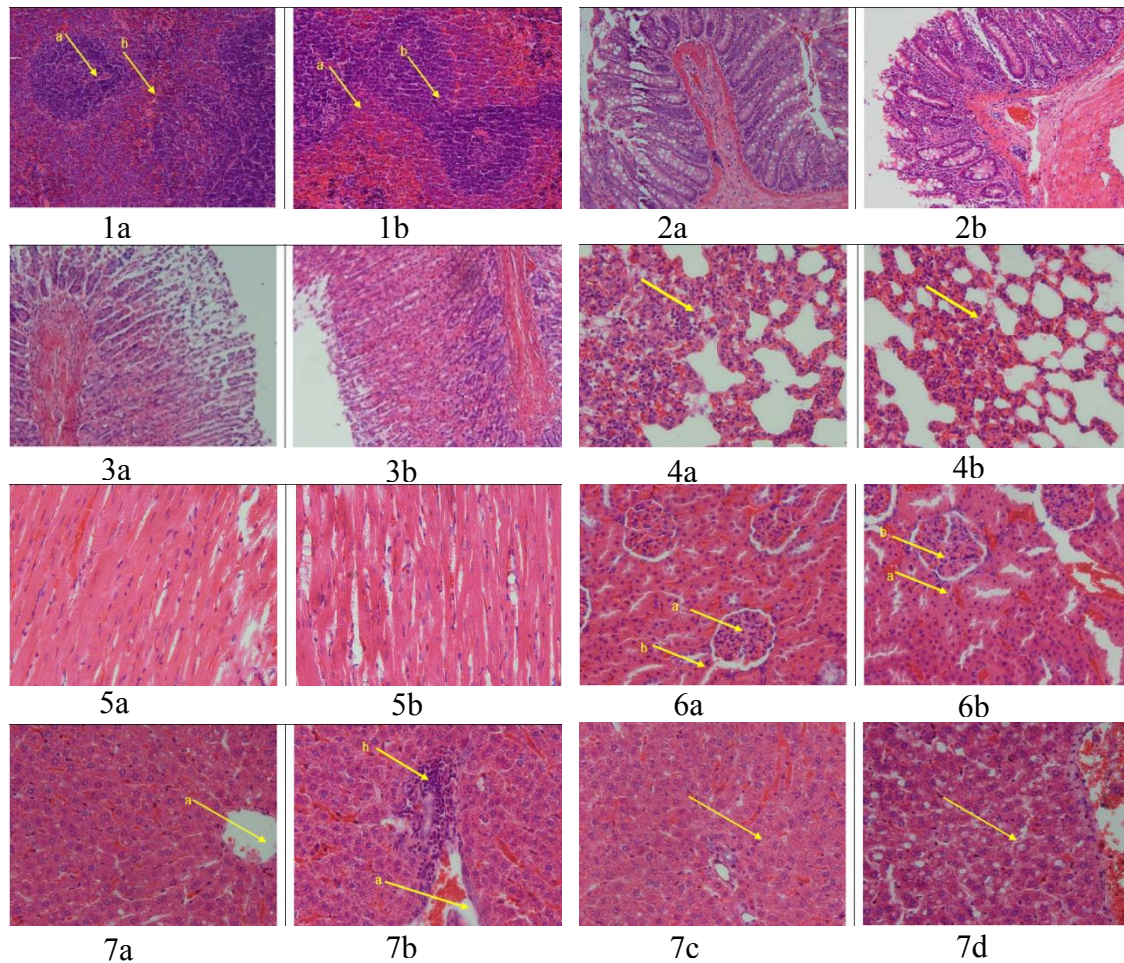
Berdasarkan grafik perubahan berat badan tikus baik pada kelompok perlakuan maupun kontrol selama periode waktu pengamatan terlihat bahwa pada semua kelompok uji mempunyai rata-rata berat badan yang terus meningkat dan tidak berbeda signifikan antar kelompok uji ( $P > 0,05$ ) (Gambar 1).



**Gambar 1.** Pengaruh ekstrak etanolik biji buah pinang terhadap penurunan berat badan. Tikus ditimbang pada hari pertama, ke-3, ke-9, dan ke-14, kemudian dibuat rata-rata. Pada semua kelompok menunjukkan kenaikan berat badan setiap waktu dan tidak menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok uji ( $P > 0,5$ ).

Hasil pengamatan patologi secara makroskopis terhadap organ-organ penting tikus setelah pemberian ekstrak uji sampai dengan peringkat dosis tertinggi tidak memperlihatkan adanya penyimpangan baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol. Hal ini terlihat dari penampakan fisik maupun bobot organ. Pada organ paru, terlihat adanya warna kemerahan yang mengindikasikan terjadinya radang. Namun penampakan fisik tersebut terjadi baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol, sehingga diduga terjadinya radang bukan karena perlakuan sampel.

Hasil pengamatan mikroskopis (Tabel 3) menunjukkan bahwa pada organ limpa kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol terdapat pulpa merah dan pulpa putih yang normal. Pada organ usus, lambung jantung dan ginjal tampak normal. Pada paru mengalami infiltrasi sel radang yang ditunjukkan banyaknya sel limfosit (berwarna ungu), namun baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol tidak ada perbedaan (Gambar 2.4a dan 2.4b). Pada organ hepar kelompok I-III dan kelompok kontrol terlihat normal, kecuali kelompok IV yang terdapat multifokal infiltrasi, yaitu adanya sel radang disekitar pembuluh darah dan adanya perlemakan pada vakuola (Gambar 2.7b dan 2.7d; Tabel 3). Dari hasil pengamatan secara mikroskopis tersebut, hampir tidak ditemukan perubahan histopatologi organ pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol.



**Gambar 2.** Organ-organ penting tikus pada kelompok perlakuan dosis tinggi (kelompok IV) dengan kelompok pelarut hampir tidak menunjukkan adanya perubahan secara mikroskopis. (1a) limpa kelompok pelarut, (1b) limpa kelompok dosis IV, (2a) usus kelompok pelarut, (2b) usus kelompok dosis IV, (3a) lambung kelompok pelarut, (3b) lambung kelompok dosis IV, (4a) paru kelompok pelarut, (4b) paru kelompok dosis IV, (5a) jantung kelompok pelarut, (5b) jantung kelompok dosis IV, (6a) ginjal kelompok pelarut, (6b) ginjal kelompok dosis IV, (7a) hepar kelompok pelarut menunjukkan adanya pembuluh darah normal, (7b) hepar kelompok dosis IV, menunjukkan adanya multifokal infiltrasi sel radang (b) pada pembuluh darah, (7c) hepar kelompok pelarut tidak menunjukkan adanya perlemakan pada vakuola, (7d) hepar kelompok dosis IV, menunjukkan adanya perlemakan pada vakuola.

**Tabel 3.** Pengamatan mikroskopis terhadap organ vital tikus jantan setelah pemberian peroral sediaan uji ekstrak etanolik biji buah pinang dosis tunggal

Kelompok	Hepar	Ginjal	Paru	Lambung	Jantung	Limpa	Usus
I	-	-	+	-	-	-	-
II	-	-	+	-	-	-	-
III	-	-	+	-	-	-	-
IV	+	-	+	-	-	-	-
V	-	-	+	-	-	-	-

Keterangan :

(+) : ada; (-) : tidak ada

Untuk mendukung potensi ekstrak etanolik biji buah pinang dalam penanganan kanker yang cukup besar terutama untuk aplikasi kombinasi, maka pengujian toksisitas terhadap ekstrak etanolik biji buah pinang perlu dilakukan. Hasil uji toksisitas akut menunjukkan bahwa pada dosis 3 dan 4, terlihat beberapa tikus mengalami kesulitan bernafas, pasif dan ada yang justru hiperaktif. Akan tetapi keadaan tersebut membaik dalam 24 jam kemudian. Ekstrak etanolik biji buah pinang pada dosis tinggi dimungkinkan mempengaruhi saluran pernafasan dan somatomotor, namun dapat pulih dengan segera. Hasil pengamatan juga menunjukkan tidak ada satupun tikus yang mati akibat perlakuan, sehingga LD<sub>50</sub> tidak dapat dinyatakan dengan pasti. Oleh karena itu, pada penelitian ini potensi toksisitas akut hanya bisa dinyatakan sebagai LD<sub>50</sub> semu, yaitu dosis terbesar yang secara teknis masih dapat diberikan pada hewan uji. Dalam penelitian ini LD<sub>50</sub> semu ekstrak etanolik biji buah pinang adalah sebesar 10 g/kgBB. Hasil histopatologi organ kelompok perlakuan hampir tidak berbeda dibanding kelompok kontrol, kecuali hepar pada dosis tertinggi (kelompok IV) mengalami peradangan dan perlemakan. Secara umum potensi toksisitas ekstrak etanolik biji buah pinang termasuk kategori **praktis tidak toksik** sesuai tabel 1 karena LD<sub>50</sub> semu ekstrak etanolik biji buah pinang berada pada rentang 5-15 g/kg BB.

### **KESIMPULAN**

Potensi toksisitas akut ekstrak etanolik biji buah pinang termasuk kategori **praktis tidak toksik** dengan nilai LD<sub>50</sub> semu sebesar 10 g/kgBB.

### **UCAPAN TERIMA KASIH**

Terima kasih kepada DP2M Dirjen DIKTI Departemen Pendidikan Nasional (Hibah Bersaing XV.1 2007) yang telah membiayai penelitian ini.



## DAFTAR PUSTAKA

1. D.J. Ecobichon, *The Basis of Toxicity Testing*, 2<sup>nd</sup> Edition, CRC Press, Boca Racon, New York, 1997, 43-60.
2. C.K. Wang and W.H. Lee, Separation, Characteristics, and Biological Activities of Phenolics in Areca Fruit, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**(8):2014 -2019.
3. K.K. Lee and J.D. Choi, The Effects of Areca Catechu L Extract on Anti-Inflammation and Anti-Melanogenesis, *International Journal of Cosmetic Science*, 1999, **21**(4):275–284.
4. G. Nonaka, Isolation and structure elucidation of tannins, *Pure & Appl. Chem*, 1989, **61** (3): 357-360.
5. A.M. Fine, Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications, *Altern Med Rev*, 2000, **5**(2):144-151.
6. S. Handayani, E. Meiyanto, and R.A. Susidarti, Areca (*Areca catechu* L.) Seeds Ethanolic Extract and Its Chloroform Fraction Induce Apoptosis and Decrease COX-2 Expression on WiDr Cells, *Proceeding The International symposium on Molecular targeted Therapy*, ISBN: 978-979-95107-6-1, Faculty of Pharmacy UGM, 2008, pp. 67-74.
7. F. Rahmi, E. Meiyanto, and R.A. Susidarti, Apoptosis effect of *Areca catechu* L. chloroform fraction on T47D cells, *Proceeding The International Symposium on Molecular Targeted Therapy*, ISBN: 978-979-95107-6-1, Faculty of Pharmacy UGM, 2008, pp. 75-82.
8. E. Meiyanto, R.A. Susidarti, S. Handayani, and F.Rahmi, 2008<sup>1</sup>, Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu* L.) Mampu Menghambat Proliferasi dan Memacu Apoptosis Sel MCF-7, *MFI*, 2008,**19**(1), 12-19.
9. E. Meiyanto, S. Handayani, R.A. Susidarti, and R.I. Jenie, Chloroform fraction of Areca (*Areca catechu* L.) Induces apoptosis an decreases BCI-2 expression on MCF-7 cells, *Mal. J. Pharm.*, 2009, Vol 1 (**7**): 290-294.
10. E. Meiyanto, S. Handayani, R.A. Susidarti, and R.I. Jenie, Areca (*Areca catechu* L.) Seeds Ethanolic extract and its chloroform fraction increase apoptotic effect of doxorubicin on human colon cancer cells, *J. Bahan Alam Ind.*, 2008, 6(5): 169-175.
11. E. Meiyanto, S. Handayani, R.A. Susidarti, and E.P. Septisetyani, Areca (*Areca catechu* L.) Seeds Ethanolic Extract and Its Chloroform Fraction Increase Apoptotic Effect of Doxorubicin on MCF-7 Cells, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 2009, vol 7 No. 1: 13-18.