

## **Pengujian Toksisitas Akut Obat Herbal Pada Mencit Berdasarkan *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD)**

### **The acute toxicity test of herbal medicine in mice based on *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD)**

**Wiku Adi Sasmito<sup>1</sup>, Agustina Dwi Wijayanti<sup>2</sup>, Ida Fitriana<sup>2</sup>, Puspa Wikan Sari<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Indonesia

<sup>2</sup> Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

Email : tinabdy@ugm.ac.id

#### **Abstract**

The toxicity test is a necessary or mandatory task needed for a candidate of commercially herbal. This pre-clinic test is pharmacologically and toxicologically important as a consideration to determine dose, frequency and administration of herbal. Superjamu is traditional herbs of Indonesia as tested subject, was formed as liquid formulation and served through oral administration. The toxicity test selected was a procedure based on Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) 423 (2002) that had claimed as standard method by 33 European countries as member of OECD. The main advantages of the method are the lesser of animal (mice) that used and the short duration of time to find the result. In the stage 1 of test, the animals used were 9 female adult mice, 25 g of body weight and divided as 3 groups. Group 1 was treated with dose of herbal 300 mg/kg of body weight, group 2 with 2000 mg/kg of body weight and group 3 (control) had given aquadest of 1 mL/kg of body weight. The herbal was administrated orally daily with sonde during 14 days. The stage 1 of experiment showed the clinical sign of depression, stiff hair, and locomotor incoordination. There was resulting death of one animal at the 14<sup>th</sup> day of experiment. Because of the mortality that resulted from first dose, the experiment continued to the second stage using dose of 50 mg/kg of body weight on 2 groups of 3 animals each (treatment and control group) during 14 days. The second stage was resulted neither clinical sign of toxicity or mortality of mice. It concluded that toxic dose of herbal was >50-300 mg/kg of body weight (category 3) and the lethal dose (LD50) was 200-300 mg/kg of body weight according to Annex 2c:OECD/OCE.

**Keywords :** toxicity test, herbal, mice.

#### **Abstrak**

Uji toksisitas perlu dilakukan pada suatu produk obat yang akan dipasarkan. Uji awal (*screening test*) ini sangat penting secara farmakologi dan toksikologi karena akan digunakan untuk pertimbangan penentuan dosis, rentang waktu pemberian dan aplikasinya. Superjamu yang diuji merupakan campuran herbal yang telah dibentuk menjadi sediaan cair dan diaplikasikan secara per oral. Metode pengujian toksisitas yang dipilih berdasarkan pedoman *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) 423 (2002). Metode ini merupakan metode standar yang diakui oleh 33 negara Eropa yang merupakan anggota dari OECD. Kelebihan utama metode ini adalah sedikitnya penggunaan hewan model (mencit) serta waktu ujinya yang relatif cepat. Sebanyak 9 ekor mencit betina umur 3 bulan dengan berat badan berkisar 25 g dibagi menjadi 3 perlakuan (n=3). Kelompok 1 diberi jamu dosis 300 mg/kg berat badan, kelompok 2 dosis 2000 mg/kg dan kelompok 3 (kontrol) diberi aquades 1 mL/kg berat badan. Pemberian jamu dilakukan per oral menggunakan spet bersonde setiap hari selama 14 hari. Tahap pertama masih terdapat kematian pada kelompok 2 dan gejala klinis berupa rambut berdiri, depresi dan gejala syarafi pada kelompok 1 sehingga dilanjutkan dengan uji kedua menggunakan dosis 50 mg/kg berat badan pada 2 kelompok yaitu kelompok perlakuan (KP) dan kelompok kontrol (KK) masing masing terdiri dari 3 ekor mencit, selama 14 hari. Hasil pengujian tahap kedua tidak ditemukan gejala klinis keracunan pada hewan coba. Kesimpulan dari pengujian ini adalah nilai dosis toksik jamu adalah > 50-300 mg/kg bb dan perkiraan dosis letal (LD50) adalah 200-300 mg/kg bb seperti disebutkan dalam Annex 2c: OECD/OCE.

**Kata kunci :** uji toksisitas, jamu, mencit.

## Pendahuluan

Pengujian toksisitas penting dilakukan untuk memperkirakan derajat kerusakan yang diakibatkan suatu senyawa terhadap material biologik maupun nonbiologik. Pengujian lazim dilakukan pada suatu calon produk untuk memenuhi persyaratan edar dan perijinan dari suatu wilayah atau negara. Skrining toksikologi sangat penting dalam perkembangan obat baru serta untuk mengetahui potensi terapi yang dimiliki oleh suatu molekul obat. Pengujian toksisitas secara umum ditujukan untuk mengetahui efek yang tidak dikehendaki oleh suatu obat terutama terhadap kejadian kanker, gangguan jantung dan iritasi kulit atau mata (Parasuraman, 2011). *United States of Food and Drug Administration* (FDA) menyatakan bahwa skrining dilakukan terhadap senyawa yang berpotensi obat atau toksik pada hewan.

Pengujian toksisitas akut dilakukan untuk menentukan efek dari pemberian dosis tunggal suatu senyawa pada hewan. Umumnya direkomendasikan pengujian ini dilakukan terhadap dua jenis hewan (rodensia dan non rodensia). Produk yang diuji diberikan pada hewan coba dengan dosis yang berbeda, kemudian dilakukan pengamatan selama 14 hari. Kematian yang terjadi selama masa pengujian diamati, diuji secara morfologi, biokimia, patologi dan histopatologi dicatat dan diamati. Pengujian akut menghasilkan nilai *Lethal dose* (LD50). Pada umumnya penentuan *lethal dose* memerlukan jumlah hewan dalam jumlah besar, yang merupakan hambatan dalam melakukan uji toksisitas. Superjamu merupakan sediaan herbal yang sedang diuji lapang dengan berbagai dosis dan frekwensi pemberian setiap hari dan selang beberapa hari.

*The OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* (OECD, 2004) merupakan standar yang diterima secara internasional untuk menguji keamanan produk, meliputi bahan kimiawi, pestisida, perawatan dan lain-lain. Standar ini selalu ditinjau oleh banyak pakar dari berbagai negara yang termasuk anggota OECD. Metode ini dipilih untuk menguji keamanan produk Superjamu, sebagai produk yang akan diedarkan untuk memperkirakan dosis toksik. Metode ini dianggap cukup ideal karena menggunakan sedikit hewan coba, mudah aplikasinya dan dapat sekaligus memperkirakan nilai LD 50. Pengujian toksikologi juga dapat digunakan untuk menghitung *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL) dan bermanfaat untuk uji klinik (Setzer and Kimmel, 2003). Pandangan moderen yang mulai beralih pada sumber obat-obatan natural semakin meningkat. Aspek toksikologi yang masih belum banyak diketahui dari pemakaian bahan pangan maupun obat dikarenakan alasan penggunaan yang turun menurun harus mulai beralih ke penelitian toksikologi karena semakin banyaknya bahan-bahan natural yang dimanfaatkan untuk pengobatan (Lee *et al.*, 2003).

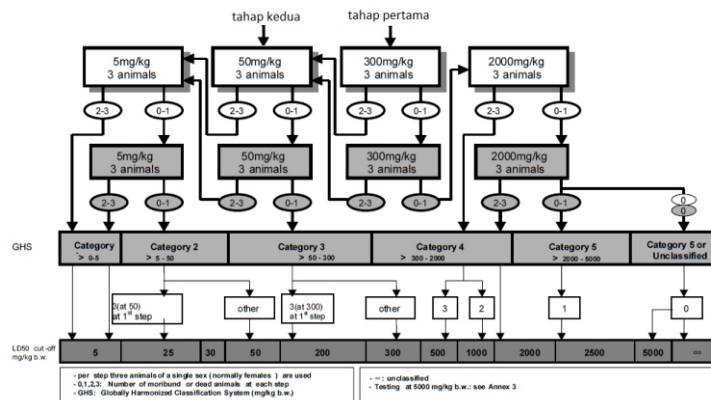
## Materi dan Metode

Materi penelitian tahap pertama adalah 9 mencit betina galur Swiss umur 3 bulan dengan rerata berat 25,8 g yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Laboratorium Pengembangan dan Penelitian Terpadu Universitas Gadjah Mada. Tahap kedua penelitian menggunakan 6 ekor mencit dengan kondisi fisiologis yang sama dengan tahap pertama. Alat-alat pendukung meliputi, spet bersonde, kandang berbahan dasar plastik, tempat pakan dan minum, aquades dan

kloroform untuk etanasi. Ekstrak yang diuji adalah sediaan cair Superjamu untuk hewan yang diproduksi oleh kolaborasi antar institusi dan industri rakyat di Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Indonesia.

Metode yang digunakan mengacu dari OECD (OECD, 2004) mengenai pengujian toksisitas akut per oral. Tahap pertama dimulai dengan membagi 9 ekor mencit menjadi 3 kelompok secara acak dan diadaptasikan selama 5 hari. Pakan dan minum disediakan secara *ad libitum* dan setiap kelompok dikandangan tersendiri. Penelitian dilakukan dalam suhu ruang (25° C) serta pengaturan cahaya redup dan terang dalam interval 12 jam. Setelah adaptasi hewan kelompok 1 (K1) diberi superjamu dosis 300 mg/kg berat badan, kelompok 2 (K2) diberi superjamu dosis 2000 mg/kg bb dan kelompok

kontrol (K3) diberi aquades 1 mL/ kg berat badan. Pemberian herbal dilakukan setiap hari selama 14 hari. Selama perlakuan dilakukan pengamatan klinis terhadap semua kelompok dan dilakukan penimbangan bobot badan. Mencit yang mengalami kematian atau gejala klinis berat segera dinekropsi dan dikorbankan menggunakan inhalasi kloroform. Tahap kedua dilakukan setelah hasil dari tahap pertama menunjukkan gejala toksisitas dan kematian. Dosis kedua menggunakan dua kelompok mencit (n=3), yaitu kelompok perlakuan (KP) menggunakan dosis 50 mg/kg per dan kelompok kontrol (KK) hanya diberi aquades 1 mL/kg bb. Perlakuan secara per oral selama 14 hari dan dilakukan pengamatan seperti pada tahap pertama. Secara metodis acuan prosedur yang digunakan mengacu pada Gambar 1.



Gambar 1. Acuan prosedur pengujian toksisitas akut (OECD, 2002). Tahap pertama dimulai dengan dosis 300mg/kg bb. Tahap kedua dilakukan setelah tahap pertama selesai dengan dosis 50mg/kg bb. (tanda panah)

### Hasil dan Pembahasan

Selama masa pengujian terdapat kematian 2 ekor mencit pada K 2 pada hari ke 14. Sebelum kematian didahului dengan gejala depresi dan bulu berdiri serta gejala syaraf yaitu inkoordinasi. Satu ekor yang lain menampakkan gejala klinis yang sama. Pada K1 gejala klinis yang sama tampak juga pada 2 ekor mencit, namun tidak terjadi kematian.

Sesuai dengan ketentuan OECD, maka ketiga mencit yang mengalami depresi dan bulu berdiri (dua dari kelompok 1 dan satu dari kelompok 2) dianestesi menggunakan kloroform dan dinekropsi bersama dengan mencit yang mati pada kelompok 2. Hasil dari gambaran histopatogik jaringan belum dapat dilaporkan dalam naskah ini. Gejala klinis yang tampak pada mencit seperti diperlihatkan pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Depresi dan bulu berdiri terutama pada daerah tengkuk/leher



Gambar 3. Gejala syarafi berupa inkoordinasi lokomotor sebelum kematian

Dikarenakan masih terjadi kematian maka pengujian dilanjutkan dengan tahap selanjutnya yaitu menurunkan dosis menjadi 50 mg/kg bb. Pada tahap 2 digunakan 6 ekor mencit betina dibagi menjadi kelompok perlakuan (KP) dan

kontrol (KK) dengan dosis perlakuan 50 mg/kg bb selama 14 hari. Selama pengujian tidak terlihat gejala klinis pada semua mencit. Rangkuman kondisi mencit selama pengujian dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kondisi fisik dan berat badan mencit selama pengujian toksisitas akut

Nilai rata-rata berat badan kelompok	tahap 1			tahap 2	
	Kelompok 1 (K1)(dosis 300 mg/kg bb)	kelompo (dosis 2000 mg/kg bb)	kelompok kontrol (K3) (aquades 0,1 mL/10 g)	kelompok perlakuan (KP) ( dosis 50 mg/kg bb)	kelompok Kontrol (KK) (aquades 0,1 mL/10 g)
sebelum perlakuan	25,875 g	25,75 g*	25,8 g	26,46 g	26 g
setelah perlakuan	26 g	22,95 g*	26,35 g	25,1 g	25,5 g
kondisi hari ke	2 ekor tampak gejala depresi, bulu berdiri	satu ekor mati, 2 ekor tampak gejala klinis bulu berdiri dan depresi)	normal	normal (tidak tampak gejala toksik)	normal

Catatan: tanda \* pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) KP=kelompok perlakuan, KK=kelompok kontrol

Hasil pengujian menunjukkan bahwa dosis 50 mg/kg bb merupakan dosis yang tidak memberikan gejala toksisitas hingga hari ke-14. Dengan demikian batas dosis ini aman dan bisa diberikan pada hewan berturut turut selama 14

hari. Sesuai dengan annex 2c.OECD maka dosis toksik superjamu adalah  $> 50-300$  mg/kg bb. Dosis lethal (LD50) pada kisaran 200-300 mg/kg bb. Penentuan dosis toksik dan dosis lethal menggunakan metode OECD memiliki

kelebihan dibanding metode pengujian toksisitas lain karena menggunakan sedikit hewan coba serta teknik pengujian yang mudah. Menurut Combes *et al.*, 2004), regulasi pengujian toksisitas dengan hewan coba harus memperhatikan kesejahteraan hewan, dengan menggunakan sesedikit mungkin jumlah hewan coba, serta hasil pengujian nantinya bermanfaat diaplikasikan ke manusia.

Sebelum aplikasi lapangan/klinik pengujian keamanan obat harus dilakukan terhadap hewan coba. Hasil dari pengujian ini merupakan evaluasi terhadap efek obat terhadap jaringan dan organ, hubungan dosis dan respon, efek terhadap pasien serta berbagai komplikasi yang mungkin timbul selama pengujian. Pengujian toksisitas umumnya menggunakan paling tidak 3 dosis (rendah, sedang dan tinggi) serta menggunakan kontrol untuk membandingkan efek dari kelompok perlakuan (Robinson *et al.*, 2009). Pengujian *in vivo* menggunakan hewan laboratorium umum dilakukan untuk mendapatkan data toksisitas akut. Uji toksisitas *in vivo* tetap diperlukan karena memiliki beberapa keuntungan diantaranya adalah akan diperoleh data-data yang berhubungan dengan kondisi fisiologi dan biokimia normal dan hasil pengujian *in vivo* hewan coba dapat diinterpolasikan ke manusia atau sebagai bahan prediksi toksikologi untuk hewan domestik dan ternak (Sachana and Hargreaves, 2012).

Sebagaimana lazimnya senyawa obat, maka jamu atau herbal juga memiliki efek yang bisa merugikan jika tidak disertai pemahaman tentang aturan dosis dan pemakaian yang tepat.

Superjamu merupakan campuran berbagai ekstrak tanaman herbal diantaranya, bawang putih, kunyit, jahe, daun katuk dan beberapa senyawa herbal lain dalam air dengan persentase komposisi yang belum dicantumkan dalam kemasan. Efek yang tidak diinginkan umumnya terjadi karena bahan yang belum terstandar, takaran yang belum tepat, efek kombinasi senyawa penyusun, sifat higroskopis dan volumius atau kemungkinan kontaminasi oleh mikrobia lain. Bisa juga efek tidak diinginkan timbul karena tambahan senyawa dalam herbal. Kesalahan efek dan penggunaan bisa juga menyebabkan kerugian, misalnya kunyit baik dikonsumsi untuk peluruh rahim dan baik dikonsumsi saat haid, namun bisa menyebabkan keguguran pada kehamilan muda. Biji jarak (*Ricinus communis*) dapat dimodifikasi menjadi antikanker, namun jika bijinya dikonsumsi racun, resin yang terkandung di dalamnya bersifat toksik dan menyebabkan diare (Audi *et al.*, 2005). Hasil penelitian menunjukkan dosis toksik yang mengindikasikan toksisitas tinggi yaitu LD 50 200-300 mg/kg bb (Tiwari and Sinha, 2010) untuk pemberian per oral setiap hari. Penelitian uji toksisitas terhadap formula polih herbal yang dilakukan oleh Seong dan Sae (2010) memberikan hasil tidak adanya gejala klinis keracunan selama pengujian. Namun aplikasi herbal dilakukan secara dosis tunggal bertingkat 2000 – 250 mg/kg bb. Dengan demikian hasil penelitian terhadap superjamu menunjukkan bahwa pemberian setiap hari tidak dianjurkan, dan agar segera dilakukan penelitian selanjutnya untuk menentukan frekwensi pemberian obat yang tepat.

## Kesimpulan

Pengujian toksisitas akut superjamu berdasarkan metode OECD pemberian per oral setiap hari selama 14 hari menghasilkan dosis toksik dan lethal masing masing sebesar >50-300 mg/kg bb dan 200-300 mg/kg bb.

## Ucapan Terima Kasih

Tim penulis mengucapkan terima kasih Kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi atas pendanaan penelitian ini melalui Hibah Riset Berbasis Kolaborasi Nasional tahun 2015.

## Daftar Pustaka

- Audi, J., Belson, M., Patel, M., Schier, J. and Osterloh, J. (2005) Ricin Poisoning : a Comprehensive review. *J. American Medical Association*. 294(18):2342-51
- Combes, R.D., Gaunt, J. and Balls, M. (2004) A scientific and animal welfare assessment of the OECD Health effects test guidelines for the safety testing under the European Union REACH system. *Altern Lab Anim*. 32:163-208
- OECD Guidelines for The Testing of Chemicals. Section 4. (2002) Test N0 423: Acute toxicity-Acute Toxic Class Method. OECD iLibrary. 2-14
- Lee, J.E., Kim, H.J., Choi E.K., Chai, H.Y., Yun, Y.W., Kim, D.J., Nam, S.Y., Lee, B.J. Ahn, B.W., Kang, H.G., and Kim, Y.B. (2003) Four-week repeated-dose toxicity study on Pinellia Extract. *Korean J. Lab. Anim. Sci*. 19:127-141.
- Parasuraman P. (2011) Toxicological screening. *J. Pharmacol Pharmacother*. Apr-Jun;2(2):74-79
- Robinson, S., Chapman, K., Hudson, S., Sparrow, S., Spencer-Briggs, D., and Danks A. (2009) *Guidance on dose level selection for regulatory general toxicology studies for pharmaceuticals*. London. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research Laboratory Animal Science Association (NC3Rs)/Laboratory Animal Science Association (LASA) [Last accessed on 2010 Dec 25]. Available from: <http://www.nc3rs.org.uk/document.asp?id=1317>.
- Sachana, M. and Hargreaves, A.J. (2012) *Toxicological testing: in vivo and in vitro models*. In Veterinary Toxicology, Basic and Clinical Principles. 2nd Ed. Editor Ramesh C.Gupta. Elsevier. Amsterdam.62-77
- Seong, S.R. and Sae, K.K. (2010) Mouse Single Oral Dose Toxicity Study of DHU001, a Polyherbal Formula. *Toxicol Res*. Mar; 26(1): 53-59.
- Setzer, R.W. and Kimmel, C.,A. (2003) Use of NOAEL, benchmark dose, and other models for human risk assessment of hormonally active substances. *Pure Appl Chem*. 75:2151-8.
- Tiwari, R.M. and Sinha, M. (2010) *Veterinary Toxicology*. Oxford Book Co. Jaipur.India.1-10