

KEAMANAN STEVIA HASIL BUDIDAYA B₂P₂T₀2T DALAM ASPEK TERATOGENITAS

Lucie Widowati,* Awal Prichatini Kusumadewi,** Sri Murhandini***

*STEVIA SECURITY FROM CULTIVATION RESULT OF B₂P₂T₀2T
IN ASPECT OF TERA TOGENITAS*

Abstract

*Teratogenic test has been performed on sweet stevia as product of B₂P₂T₀2T cultivation at rats (*Rattus novergicus*) pregnant female Wistar. Stevia sweet was administered orally at a dose of 360, 120 and 40 mg/kg bw, volume 1 ml/100g bw per day during organogenesis period, on the day of pregnancy to the 6th until 15th. During the test, test animals were observed two times daily with the distance of six hours against the toxicity symptoms such as changes in skin, hair, eyes and mucous membranes, bleeding. Animals that experienced abortion, premature birth or death during the trial period were sacrificed and observed immediately with microscopic technic. At 20th day of pregnancy all of the pregnant rat dissected, and put out the fetuses from the mother's and observed the health conditions in general and the whole of mothers reproductive systems of fetuses, the outer fetal malformation and soft tissue system of fetal. The conclusion were sweet stevia of B₂P₂T₀2T no worse effect on the mother rats, fetal body weight and morphology of mother rats and the fetus, does not affect the process of development of fetal soft tissue, and does not affect the development of fetal skeleton. Generally the B₂P₂T₀2T stevia sweet substances safe for used, does not cause teratogenic effects.*

Keywords: Teratogenic, stevia sweet of B₂P₂T₀2T T cultivation, Stevia rebaudiana Bertonii

Pendahuluan

Tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni M.) sangat potensial dikembangkan sebagai bahan baku gula (pemanis) alami, pendamping gula tebu dan pengganti gula sintetis. Daun stevia mengandung senyawa glikosida diterpen dengan tingkat kemanisan 200 D 300 kali gula tebu tetapi kalorinya sangat rendah, sehingga mempunyai keunggulan lain dapat digunakan oleh penderita diabetes maupun pada penderita kegemukan. Zat manis dalam stevia disebut stevisoida. Gula stevia telah dikomersilkan di Jepang, Korea, RRC, Amerika Selatan untuk bahan pemanis bagi penderita diabetes dan kegemukan. Di Jepang dan Brazilia, stevia selain digunakan sebagai pemanis

buatan untuk penderita diabetes, juga diijinkan digunakan dalam makanan. Di Amerika, penggunaan stevia untuk zat tambahan makanan (*food additive*) masih belum mendapat ijin dari FDA karena alasan keamanannya. Stevia dilaporkan menimbulkan efek karsinogenik dan mutagenik. Tetapi hal ini masih menjadi pertentangan mengingat ada beberapa hasil penelitian yang menyatakan stevia menunjukkan efek mutagenik, efek mutagenik lemah dan ada yang menyatakan tidak ada masalah dengan keamanannya. Efek mutagenik dan karsinogenik diduga disebabkan oleh adanya hasil metabolit stevisoida yang disebut steviol. Puluhan hasil penelitian mengenai keamanan stevisoida dan steviol

* Puslitbang Biomedis dan Farmasi,

** B₂P₂T₀2T,

*** Badan POM

telah dilakukan. Hasil uji toksisitas akut (LD_{50}) terhadap steviosida dan steviol terhadap 3 jenis hewan coba yaitu mencit, tikus dan hamster, menunjukkan bahwa steviosida sampai 15 g/kg bb tidak menyebabkan kematian pada ketiga jenis hewan. LD_{50} steviol pada hamster 5,2 dan 6,10 g/kg bb masing-masing untuk jenis kelamin jantan dan betina; sedangkan LD_{50} steviol pada mencit dan tikus lebih besar dari 15 g/kg bb. Hal ini menunjukkan bahwa steviosida maupun steviol sangat aman.¹ Penelitian lain mengenai toksisitas akut terhadap mencit yang dilakukan oleh *Japan Food Sanitation Corporation* tahun 1991, menunjukkan bahwa ekstrak stevia sangat aman. Pemberian 20 gram ekstrak stevia atau sebanding dengan 3 liter pada manusia, tidak menunjukkan kelainan setelah 7 hari. Steviosida pada dosis sampai 2,5 g/kg tidak menimbulkan bahaya pada hewan coba, tidak mempengaruhi perkembangan pertumbuhan hamster.¹ Data LD_{50} daun Stevia dari B2P2T02T Tawangmangu, menunjukkan nilai 79,81 mg/10 g (=8,0 g/kg) bb mencit, dengan pemberian intra peritoneal.³

Stevia merupakan tanaman semak semusim dengan tinggi antara 30-90 cm, dapat tumbuh pada 10-1300 dpl. Stevia ditanam dengan populasi 60.000-125.000 tanaman/ha, usia produktif 2-3 tahun, masa panen 6-7 kali/tahun. Didataran rendah stevia cepat berbunga dan mudah mati apabila sering dipanen. Stevia yang ditanam di Indonesia berasal dari Jepang, Korea dan China. Bahan tanaman tersebut berasal dari biji sehingga pertumbuhan tanaman stevia di lapangan sangat beragam."¹

Stevia sudah mulai ditanam massal di berbagai perkebunan di Indonesia, dan dibudidayakan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman obat Obat tradisional (B₂P₂T₀2T). Saat ini B₂P₂T₀2T sedang berusaha menurunkan satu galur Stevia varietas unggul dari 4 galur harapan stevia. Mengingat banyaknya terjadi kontroversi dalam keamanan terhadap beberapa produk pemanis buatan yang sudah digunakan, maka untuk mendukung data keamanannya diperlukan pengujian (toksikronis, uji mutagenik, uji karsinogenik maupun teratogenik) pada Stevia induk B2P2T02T. Penelitian ini belum pernah dilakukan, mengingat bahwa budidaya Stevia di Indonesia belum banyak dilakukan. Pada penelitian awal akan dilakukan uji toksisitas akut dan teratogenik pada

hewan tikus. Penelitian bertujuan untuk mendapatkan data keamanan zat manis stevia budidaya B₂P₂T₀2T sebagai bahan tambahan makanan (*food additive*). Tujuan khusus adalah untuk mengetahui adanya efek toksik pada janin akibat pemberian bahan uji hewan bunting.

Manfaat penelitian adalah mendapatkan stevia galur B₂P₂T₀2T sebagai pengganti pemanis buatan yang aman.

Bahan dan Cara Kerja

Bahan

Zat manis dari *Stevia rebaudiana* yang diekstraksi dengan pelarut air,⁵ diperoleh dari Balai Besar Penelitian Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B₂P₂T₀2T), Tawangmangu.

Hewan coba

Hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*), galur Wistar, jenis kelamin jantan dan betina, umur \pm 2 bulan, bobot badan rata-rata 160-200 gram, berasal dari Puslitbang Biomedis dan Farmasi.

Percobaan^{7,8}

Merupakan penelitian eksperimental laboratorium, percobaan dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap, dengan cara pemilihan dan penarikan sampel sesuai dengan pedoman dari WHO.

Uji Teratogenitas

Prinsip kerja

Melihat pengaruh pemberian bahan uji terhadap perkembangan janin tikus putih

Cara kerja

I. Persiapan hewan uji

Digunakan 4 kelompok dosis, jumlah hewan untuk setiap kelompok 10 ekor.

Sebanyak 80 ekor tikus betina dan 50 ekor tikus jantan, dibagi menjadi 3 kelompok uji dan 1 kelompok kontrol masing-masing 20 ekor. Hewan diberi makan dan minum ad libitum. Sebelum pengujian dimulai, hewan diaklimatisasi dalam ruang percobaan selama tidak kurang dari 1 minggu sehingga hewan dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru.

2. Penentuan tahap siklus proestrus pada tikus betina

Tahap siklus proestrus betina dewasa dapat ditentukan dari perbandingan komposisi sel epitel berinti, sel epitel bertanduk dan leukosit dalam apusan vaginanya.

3. Mengawinkan tikus yang proestrus dan pembuktian perkawinan

Tiga ekor tikus betina virgin yang dalam masa proestrus disatukan dengan dua ekor tikus jantan pada sore hari. Tikus dinyatakan kawin apabila ditemukan sperma dalam apusan vaginanya pada keesokan harinya. Tikus yang terbukti kawin dinyatakan sebagai hari ke 0 dari kehamilan.

4. Pemberian zat uji secara oral pada tikus hamil

Hewan betina yang terbukti kawin dipelihara dalam kandang individual dan dikelompokkan secara acak dengan cara penomoran agar tikus yang digunakan dapat mewakili populasi keseluruhan.

Bahan uji diberikan secara oral setiap hari pada tikus hamil selama masa organogenesis (hari ke 6 sampai 15), dalam 3 kelompok perlakuan:

Kelompok I, diberi zat manis stevia 360 mg/kg bb

Kelompok II, diberi zat manis stevia 120 mg/kg bb

Kelompok III, diberi zat manis stevia 40 mg/kg bb

Kelompok IV, diberi akuades 2 cc/200g bb.

Volume pemberian 1 ml per 100 g bb per hari. Selama pemberian zat manis stevia, hewan uji diamati 2 x sehari dengan jarak 6 jam terhadap gejala toksik seperti perubahan kulit, bulu, mata dan lapisan mukosa, perdarahan. Hewan yang mengalami aborsi, lahir prematur atau mati selama masa percobaan segera dikorbankan dan diamati secara mikroskopis.

5. Pembedahan dan pengamatan teratologi umum

Pada hari ke-20 kehamilan semua induk dibedah untuk diambil fetusnya. Sebelumnya hewan dikeluarkan kemudian fetus dan implant diangkat dengan hati-hati dan diklasifikasikan sebagai berikut:

a. Fetus hidup

b. Kematian fetus (*foetal death*, FD), fetus baru saja mati, bentuknya lengkap tapi warnanya lebih pucat dari normal

c. Kematian lambat (*late death*, LD), organogenesis telah terjadi sehingga embrio sudah tampak tetapi perkembangannya tidak sampai ke tingkat fetus (resorpsi embrionik)

d. Kematian awal (*early death*, ED), kematian terjadi sesaat setelah implantasi sehingga belum terbentuk embrio, implant berupa jaringan timbul dari plasenta yang berdegenerasi (titik implantasi).

Fetus-fetus dipindahkan secara berurutan mulai dari pangkal uterus sampai ovarium, dan dilakukan: penghitungan jumlah fetus; pengamatan morfologi mulai dari kepala sampai ekor; penentuan jenis kelamin (jantan/betina); penimbangan bobot tubuh; penentuan jumlah fetus mati dan hidup; penghitungan jumlah korp ora lutea; penghitungan jumlah implant..

Sepertiga dari jumlah fetus dimasukkan ke dalam etanol 90% untuk pemeriksaan kerangka dan dua per tiga dari jumlah fetus diikat satu persatu secara berurutan dan diberi nomor induk, dimasukkan ke dalam larutan Bouin sekurang-kurangnya 10-14 hari untuk pemeriksaan jaringan lunak..

6. Fiksasi fetus dan penilaian jaringan lunak"

Fetus yang telah difiksasi dengan larutan Bouin selama 1-2 minggu disayat dengan pola tertentu. Kepala bagian atas di antara kedua rahang dan di sebelah bawah telinga dipotong menggunakan pisau mikrotom silet, dan permukaan langit-langit diperiksa lalu diletakkan di sebelah bawah dan sayatan melintang kepala dibuat dari hidung berurutan ke arah belakang dengan jarak maksimum 1 mm dengan mengutamakan hidung, mata dan ventrikel lateral, sayatan-sayatan diletakkan dalam plat tetes berisi air hingga terendam.. Selanjutnya kulit di sekitar perut ditoreh menggunakan pisau, bagian depan dipotong dan dibuang, organ dalam rongga perut dikeluarkan, keadaan ureter, kelenjar kelamin dan kandung kemih diperiksa, dilihat penyimpangan dari kondisi normal..

Penilaian dilakukan dengan membandingkan fetus perlakuan terhadap fetus kontrol di bawah mikroskop stereo dengan pembesaran 4-10 X terhadap jumlah, bentuk, ukuran dan posisi organ. 10 Organ yang dinilai pada pengamatan

jaringan lunak yang telah difiksasi dalam larutan Bouin adalah langit-langit/rongga mulut, rongga hidung, mata, otak, trakea, esopagus, tikus, jantung/pembuluh darah, paru-paru, diafragma, hati, lambung, limpa, usus, adrenal, ginjal, ureter, kelamin dan ekor.¹⁰

7. Pembuatan preparat kerangka tikus¹⁰

Tahap pekerjaan meliputi: pembuangan kulit dan organ bagian dalam; penjernihan jaringan; pemutihan; pewarnaan kerangka; pembersihan akhir..

Fetus yang sudah berwarna merah ungu dibilas dengan air beberapa kali kemudian direndam secara bertahap dalam larutan gliserol 5, 20, 40 dan 80% masing-masing selama 1 minggu.

8. Penilaian kerangka

Pengamatan dilakukan setelah preparat direndam dalam larutan gliserol 80% paling sedikit seminggu. Kerangka terlihat berwarna merah diantara jaringan yang jernih. Analisis berupa pengukuran relatif dan absolut tulang, distribusi warna, struktur, morfologi, jumlah, ukuran dan posisi tulang, dibandingkan dengan kelompok kontrol.¹¹ Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop stereo dengan pembesaran 4-10 kali.

Hasil dan Pembahasan

1. Zat manis stevia

Hasil budidaya stevia B₂P₂T₀₂T menghasilkan zat manis stevia sebesar 6,5%, berupa kristal putih kering, rasa sangat manis.

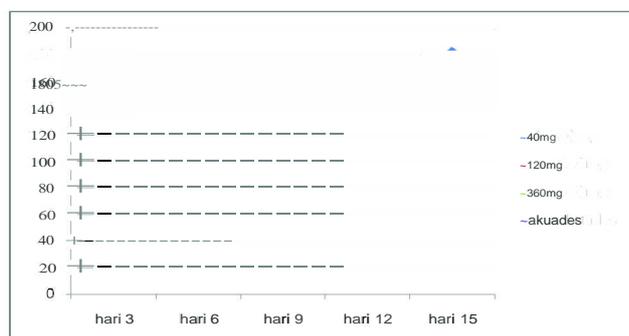
2. Uji teratogenitas

Pada uji teratogenitas, dipilih hewan uji tikus mengingat tikus adalah hewan yang berkembang biak dengan cepat (mulai umur 8 minggu), dengan masa hamil yang singkat (21 hari), mempunyai jumlah anak yang relatif banyak (6 sampai 15 ekor). Tikus mempunyai rata-rata cacat atau malformasi spontan sebesar 1%.¹² Pada uji ini, dosis maksimum yang dipersyaratkan pada tikus maksimal adalah 600 mg/kg bobot badan/hari." Pada penelitian ini, uji teratogenitas menggunakan dosis zat manis stevia B₂P₂T₀₂T sebesar 360 mg/kg bb per hari (dosis terbesar) dan menurun pada dosis 120 dan 40 mg/kg bb per hari.

Zat manis Stevia diberikan pada masa organogenesis, periode ini merupakan periode perkembangan yang labil, sehingga sangat peka akan pengaruh senyawa dari luar.. Pada periode ini akan mulai terbentuk lapisan germinal yang akan berdeferensiasi menjadi organ.¹² Selama pemberian zat manis stevia hari ke-6 sampai ke-IS, induk hamil tidak menunjukkan gejala-gejala toksik seperti perubahan pada kulit, bulu, mata dan lapisan mukosa. Juga tidak terjadi pendarahan, aborsi ataupun cacat prematur.

Pemeriksaan bobot badan induk hamil (Gambar 1) tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna pada ratio bobot badan secara statistik dengan uji Student T pada $p < 0,05$ antara kelompok kontrol dan ketiga kelompok perlakuan.

Selama pemberian zat manis stevia pada masa kehamilan hari ke-6 sampai ke-IS, induk hamil tidak memperlihatkan gejala-gejala toksik seperti perubahan pada kulit, bulu, mata dan lapisan mukosa. Juga tidak terjadi kematian, pendarahan, aborsi ataupun lahir prematur.



Gambar 1. Kenaikan bobot badan

Kesuburan induk tikus kelompok I sampai IV berturut-turut nilainya adalah 75%, 78,92%, 71,43% dan 81,82%. Efek terhadap reproduksi induk seperti jumlah implant dan ratio implantasi tidak berbeda nyata antara kelompok perlakuan dan kelompok akuades. Demikian pula dengan rata-rata jumlah korpus luteum tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol, nilainya berturut-turut 8,2; 7,7; 8,28 pada kelompok dosis perlakuan dan 8,14 untuk kelompok akuades. (tabel 1)

Kelainan pada jaringan lunak terdapat pada sayatan otak, terjadi pada kelompok dosis kecil dan kelompok akuades, berupa pembesaran ventrikel. Tidak terdapat kelainan pada dosis sedang dan dosis besar. Hal ini menunjukkan bahwa kelainan tidak disebabkan oleh bahan uji. Kelainan lain adalah pada sayatan pada peritoneal ginjal berupa perbedaan posisi uretra, terjadi pada semua perlakuan dosis dan akuades dengan ratio kelainan berturut-turut 90,02%; 91,89%; 93,0% dan 92,5% pada kelompok akuades. Secara umum tidak terdapat kelainan yang spesifik pada sayatan organ lain. (Tabel 3)

Tabel 1. Efek Pemberian Zat Manis Stevia Secara Oral Terhadap Induk Hamil

Parameter	Kelompok Perlakuan			
	I	II	III	IV
Jumlah induk kawin	12	13	14	11
Jumlah induk hamil	9	10	10	9
Jumlah induk tidak hamil	3	3	4	2
Jumlah induk hamil mati	0	0	0	0
Jumlah induk hamil hidup	9	10	10	9
Jumlah induk dengan seluruh fetus hidup	9	10	10	9
Jumlah korpora luteum	82	77	116	57
(rata-rata ± SD)	8,2 ± 0,124	7,7 ± 0,823	8,28 ± 0,611	8,14 ± 0,690
Jumlah implant	71	69	109	50
(rata-rata ± SD)	7,1 ± 1,197	6,9 ± 1,370	7,78 ± 0,975	7,142 ± 1,773
Ratio implantasi (%)	86,5	89,6	93,9	87,7

Rasio implantasi adalah rata-rata kejadian pada tiap induk.

Tabel 2. Efek Pemberian Zat Manis Stevia Terhadap Perkembangan Fetus

Parameter	Kelompok Perlakuan			
	I	II	III	IV
Jumlah fetus yang diperiksa	63	60	196	40
(rata-rata ± SD)				
Jumlah fetus dengan anomali eksternal	0	0	0	0
Rasio Jenis kelamin (jantan/betina)	31/32	30/38	45/64	20/21
Bobot badan (g)				
Jantan (rata-rata ± SD)	3,38 ± 0,760	3,78 ± 0,559	3,26 ± 0,704	2,60 ± 0,941
Betina (rata-rata ± SD)	3,44 ± 0,443	3,23 ± 0,490	2,84 ± 0,786	2,65 ± 0,758
Mortalitas (%)	0	0	0	0

Mortalitas merupakan rata-rata kejadian pada tiap induk

Tabel 3. Efek Pemberian Zat Manis Stevia terhadap Jaringan Lunak Fetus

Jaringan lunak/Organ	Kelompok perlakuan			
	I	II	111	IV
a. Sayatan pertama pada kepala				
- langit-langit	+ (41/41)	+(37/37)	+ (72/72)	+ (27/27)
- saluran hidung	+ (41/41)	+(37/37)	+ (72/72)	+ (27/27)
- mata	+ (41/41)	+(37/37)	+ (72/72)	+ (27/27)
- otak	+ (41/41)	+(37/37)	+ (70/72)	+ (26/27)
- timus	+ (41/41)	+(37/37)	+ (72/72)	+ (27/27)
b. Sayatan pada toraks				
- jantung	+ (41/41)	+(37/37)	+ (72/72)	+ (27/27)
- paru	+ (41/41)	+(37/37)	+ (72/72)	+ (27/27)
c. Sayatan untuk pengamatan diafragma	+ (41/41)	+(37/37)	+ (72/72)	+ (27/27)
d. Sayatan pada peritoneal				
- Hati	+ (41/41)	+(37/37)	+ (72/72)	+ (27/27)
- Lambung	+ (41/41)	+(37/37)	+ (72/72)	+ (27/27)
- ginjal	+ (37/41)	+ (34/37)	+ (67/72)	+ (25/27)
e. Sayatan pada organ reproduksi				
- kelamin	+ (41/41)	+(37/37)	+ (72/72)	+ (27/27)

Tabel 4. Efek Pemberian Zat Manis Stevia Terhadap Multi. Anomali Kerangka Fetus

Parameter	Jumlah normal	Kelompok perlakuan			
		I	II	111	IV
Jumlah fetus yang diperiksa		23	19	25	21
Jumlah fetus dengan anomali		7	4	7	10
Skull (tengkorak)		5	2	5	8
Vertical vertebrae	7	7	7	7	7
Deformitas	0	0	0	0	0
Thoracis vertebrae	13	13	13	13	13
Hipoplasia	-	-	-	-	-
Deformitas	-	-	-	-	-
Lumbar vertebrae	6	6	6	6	6
Aplasia	-	-	-	-	-
Ribs (rusuk)	13	13	13	13	13
Bergelombang	+	+	+	+	+
Pendek	+	+	+	+	+
Stemebrae (dada)	6	5,67	5,77	5,37	5,6
Absen	-	-	-	-	-
Aplasia			2	2	
Deformitas		2			2
Terbelah	-	-	-	-	-
Keadaan penulangan					
Sacro caudal	-	-	-	-	-
Metacarpus (tangan)	4	3,67	3,35	3,71	3,68
Metatarsus (kaki)	4	4,00	3,95	3,60	3,75

Terjadi beberapa kelainan malformasi pada keadaan penulangan dan tengkorak, namun

kejadiannya sama dengan kelompok akuades. Bahkan pada kelompok akuades kelainan pada

tengkorak lebih besar daripada kelompok perlakuan.

Kesimpulan

Zat manis stevia B₂P₂T₀₂T tidak memberikan efek buruk pada induk tikus, bobot badan induk dan fetus serta morfologi fetus; tidak mempengaruhi proses perkembangan jaringan lunak fetus dan tidak mempengaruhi perkembangan kerangka fetus.

Secara umum zat manis stevia B₂P₂T₀₂T aman digunakan, tidak menimbulkan efek teratogenik dalam mendukung upaya budidaya stevia untuk mendapatkan stevia varietas unggul B₂P₂T₀₂T. .

Daftar Pustaka

1. acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species, Toskulkao, C: Chaturat, L : Temcharoen, P : Glinsukon, T. Drug Chemical Toxicology; 1997 Feb-May; 20(1-2):31-44.
2. www.puresweet.com. Stevia Safety Studies, Selected examples from the hundreds of studies attesting to the safety of stevia leaf and its extracts. Diakses 10 Mei 2008, pk. 22.00
3. Wahjoedi B. Data toksisitas akut tanaman obat Indonesia, Medika No. 10 , tahun 13, 1987: 1005-1007.
4. Rahmat Rukmana, H, Ir, MBA, Budidaya Stevia, Bahan Pembuatan Pemanis Alami, Penerbit Kanisius, 2003.
5. -----, Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Departemen Kesehatan, 2000.
6. Hayes AW., Principles and methods of Toxicology, Raven Press, Book Ltd. New York, 1984.
7. Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan, Prosedur Operasional Baku. Toksisitas, 1991.
8. OECD, The OECD Principles of Good Laboratory Practice, Organization For Economic Cooperation and Development, Paris, 1992.
9. Georg J Krinke, *Tissue fixation on The hand book of experimental animal rats*, The Laboratory Rat, Academic Press, London, 2000.
10. Manson JM., Principles and methods of toxicology, edited by Wallace Hayes, Raven Press, New York, 1982, p 141-184.
11. Taylor P. and AG. Sandaz, Practical teratology, Academic Press, London, 1986, p 1-108
12. Arlene M.Wallace and Janet L. Engstro, The effects of aerobic exercise on the pregnant woman, fetus, and pregnancy outcome, Journal of Nurse_Midwifery, Copyright © 2011 Elsevier B.V.