

ACUTE TOXICITY EVALUATION OF *Impatiens balsamina* Linn. STEM AND LEAF N-HEXANE FRACTION USING OECD 425 GUIDELINE

UJI TOKSISITAS AKUT FRAKSI N-HEKSAN EKSTRAK METANOL DAUN DAN BATANG *Impatiens balsamina* Linn. DENGAN PEDOMAN OECD 425

Benny Wijaya Sunggono, Indri Kusharyanti, Siti Nani Nurbaeti

Pharmacy Study Program, Faculty of Medicine, Universitas Tanjungpura, Tanjungpura, Indonesia

ABSTRACT

Garden balsam (*Impatiens balsamina* Linn) is a plant that has been used for joint pain, insect bite, promotes regular menstrual cycle and prevents stomach cancer. Traditionally, the leaves of garden balsam are suspected to contain poison that can affect the digestive system. The purpose of this research is to evaluate the safety of the garden balsam stem and leaf n-hexane fraction so it can be used safely. Stem and leaf Methanol extract of garden balsam was fractioned into n-hexane fraction with liquid extraction method. Phytochemical screening showed that the fraction contains triterpenoid steroid compound. The OECD Guideline no 425: Acute Oral Toxicity (Up and Down Procedure) was adopted to evaluate the safety of the fraction. Two until three months old female Sprague Dawley rat were subjected to n-hexane fraction suspension. Limit test showed that the n-hexane fraction LD_{50} is greater than 5000 mg/kgBW. There were no clinical sign of toxicity on the eye, respiration system, behavior, autonomic and somatomotoric system up to dose 5000 mg/kgBW. At that dose, the fraction did not cause mortality on rats, and did not lower the body weight, food and water consumption of rats. The fraction also did not cause any histology change to the liver and renal. Our conclusion is the fraction is safe to consume below 5000mg/kgBW. According to Loomis classification, n-hexane fraction of garden balsam steam and leaf has low toxicity.

Keywords : garden balsam, OECD 425, acute toxicity

ABSTRAK

Tanaman pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) merupakan tanaman herba yang secara empirik digunakan untuk terapi nyeri tulang, gigitan serangga, peluruh haid dan pencegah kanker pencernaan. Secara empiris, daun pacar air tidak boleh dikonsumsi secara langsung karena mengandung racun yang dapat mempengaruhi pencernaan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan tingkat keamanan dari fraksi n-heksan daun dan batang pacar air sehingga dapat dijadikan acuan untuk penggunaan terapi yang aman. Fraksi n-heksan diperoleh dari ekstraksi cair ekstrak metanol daun dan batang pacar air. Hasil penapisan fitokimia dengan uji tabung menyatakan bahwa fraksi n-heksan mengandung senyawa triterpenoid steroid. Uji toksisitas akut dilakukan dengan metode yang diadopsi dari OECD (Organization for economic co-operation and development) nomor 425: Acute Oral Toxicity (Up and Down Procedure). Hasil pengujian Limit Test menyatakan fraksi n-heksan daun dan batang pacar air memiliki nilai LD_{50} lebih besar dari 5000 mg/kg berat badan tikus. Hingga dosis 5000 mg/kgBB tidak ada tanda-tanda toksik pada sistem mata, respirasi, kelakuan, otonom dan somatomor. Pada dosis 5000 mg/kgBB, fraksi n-heksan juga tidak menyebabkan kematian pada tikus, tidak menyebabkan penurunan berat badan, tidak menyebabkan perubahan makan dan minum yang signifikan. Pemberian fraksi n-heksan pada dosis 2000 mg/kg dapat menyebabkan lesi degenerasi hidropik pada organ hati dan dapat memperparah kerusakan pada organ ginjal pada dosis 5000 mg/kg. Oleh sebab itu, penggunaannya tetap harus diperhatikan. Menurut klasifikasi Loomis, fraksi n-heksan pacar air berada dalam kategori toksik ringan.

Kata Kunci : pacar air, OECD 425, toksisitas akut

PENDAHULUAN

Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berasal dari tumbuhan, hewan, mineral

mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut, yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman. Berbeda dengan obat modern yang mengandung satu atau beberapa zat aktif yang jelas identitas dan jumlahnya, obat tradisional

Corresponding author : Benny Wijaya Sunggono
E-mail: xavesung@gmail.com

ataupun obat herbal mengandung banyak kandungan kimia dan umumnya tidak diketahui atau tidak dapat dipastikan zat aktif yang menimbulkan efek terapi maupun menimbulkan efek samping (Dewoto, 2007).

Salah satu kekayaan alam Indonesia adalah tanaman pacar air. Pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) sering digunakan sebagai tanaman hias. Secara empiris pacar air digunakan untuk sakit tulang persendian atau gigitan serangga, peluruh haid dan pencegah kanker pencernaan (Siswoyo, 2004). Hasil penelitian membuktikan bahwa ekstrak air daun pacar air memiliki aktivitas analgesik dan antiinflamasi (Debrashee *et al*, 2013). Penelitian *in vitro* ekstrak etanol daun pacar air juga membuktikan adanya aktivitas antitumor dengan LD₅₀ diatas 2000mg/kg (Baskar *et al*, 2012).

Luasnya aktivitas ekstrak tanaman pacar air membuktikan bahwa tanaman ini dapat dikembangkan menjadi salah satu agen terapi. Meskipun demikian, belum terdapat data toksisitas data keamanan ekstrak tanaman pacar air maupun fraksinya. Menurut penelitian sebelumnya, fraksi n-heksan mengandung senyawa golongan triterpenoid steroid (Adfa, 2007). Golongan senyawa tersebut terdiri dari beberapa subgolongan yang memiliki beragam aktivitas seperti antibakteri, antifungi, antiviral, sitotoksik, antikanker, antialergi dan aktivitas lainnya (Patocka, 2003).

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan pengujian toksisitas akut fraksi n-heksan ekstrak metanol bagian batang dan daun pacar air. Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mencari tingkat keamanan penggunaan tanaman pacar air khususnya kandungan senyawa nonpolarnya sebagai data untuk memenuhi kriteria aman, bermutu dan bermanfaat, sesuai dengan peraturan yang berlaku. Berdasarkan peraturan BPOM suatu produk obat tradisional dikatakan aman apabila telah diuji toksisitasnya menggunakan hewan uji meliputi toksisitas akut, subkronis, kronis dan uji mutagenitas, dan terbukti aman untuk digunakan pada manusia (BPOM, 2010).

Uji toksisitas akut adalah uji untuk mengetahui LD₅₀ atau dosis maksimal yang masih dapat ditoleransi oleh hewan uji yang hasilnya akan ditransformasi pada manusia. Data dari uji toksisitas akut dapat digunakan sebagai acuan untuk menentukan dosis yang digunakan untuk pengujian lebih lanjut misalnya uji aktivitas, uji toksisitas subkronis ataupun kronis. Tujuan uji toksisitas lainnya adalah untuk mencari tanda-tanda toksik yang dapat muncul sehingga dapat dikenali apabila terjadi keracunan kedepannya.

METODOLOGI

Bahan-bahan yang digunakan adalah simplisia daun dan batang pacar air, pelarut ekstraksi yaitu n-heksan pro analisis dan metanol teknis, *Carboxy methyl cellulose* (CMC), reagen skrinning fitokimia dan bahan pembuatan preparat histologi.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, ayakan 40 mesh, bejana maserasi, blender simplisia, cawan uap, corong pisah, *cover glass*, desikator, *hot plate* (Schott Instrument®), minor set, *object glass*, oven (memmert®), sonde oral, timbangan analitik, dan *water-bath* (Memmert TYP WNB-14®).

Hewan Uji

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague dawle*. Sampel diperoleh secara random yang memenuhi kriteria inklusi yaitu tikus putih *Sprague-dawley* betina, umur 2 – 3 bulan, berat badan 110-150 gram, tidak hamil dan sehat.

Pengambilan dan Pengolahan Sampel

Sampel berupa tanaman pacar air diambil di jalan Nirbaya Kota Baru, Kecamatan Pontianak Selatan, Kota Pontianak, Provinsi Kalimantan Barat. Batang dirajang dan dipotong kecil kecil. Daun dan batang yang telah diubah ukurannya, dikering anginkan menggunakan lemari pengering dengan suhu 37°C. Daun dan batang kering didesintegrasi dengan blender kemudian diayak dengan pengayak 40 mesh.

Proses Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan secara maserasi. Simplisia batang dan daun dimasukkan ke dalam bejana kaca, kemudian dituangi dan direndam dengan penyari metanol teknis, ditutup dan didiamkan selama 24 jam sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama, maserat ditampung pada botol kaca, kemudian dimaserasi kembali dengan pelarut baru dan dilakukan pengadukan beberapa kali sehari. Pemekatan dilakukan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak kental diencerkan dengan air panas (10 x bobot ekstrak), diaduk terus hingga encer dan homogen, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, difraksinasi secara berturut-turut secara ekstraksi cair-cair dengan pelarut n-heksan. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali untuk tiap fraksi dengan menggunakan 50 mL pelarut untuk sekali penyarian. Fraksi dikumpulkan dan dipisahkan dengan hingga diperoleh fraksi kental.

Ekstrak dan fraksi kental kemudian diencerkan lagi dengan pelarut masing masing dan dilakukan uji skrining fitokimia dengan uji tabung terhadap senyawa alkaloid, tanin, flavonoid, polifenol, saponin dan triterpenoid steroid.

Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut dilakukan berdasarkan pedoman OECD 425 : *Acute Oral Toxicity Up and Down (UDP) Procedure* (OECD, 2008).

Limit Test 2000

Menurut studi literatur ekstrak etanol pacar air memiliki LD₅₀ 2000mg/kgBB maka dilakukan *limit test* 2000 mg/kgBB. Satu hewan uji diberi dosis. Apabila setelah pengamatan 48 jam hewan tersebut tidak menunjukkan mortalitas, maka diberikan dosis yang sama pada satu hewan uji lagi. Langkah tersebut diulangi hingga maksimal hewan uji yang digunakan adalah 5 ekor. Pemberian dosis dihentikan apabila terdapat hewan uji yang menunjukkan mortalitas. Setelah lima hewan uji diberikan dosis dan tidak ada mortalitas, pemberian dosis dihentikan dan semua hewan uji diamati selama 14 hari. Apabila tiga atau lebih dari lima hewan uji mati, maka dilakukan *main test*. Apabila tiga atau lebih hewan uji yang hidup maka LD₅₀ dari sampel adalah lebih besar dari 2000 mg/kgBB.

Limit Test 5000

Limit test 5000 bertujuan untuk melihat apakah LD₅₀ sampel berada pada rentang 2000 – 5000 mg/kgbb atau berada pada rentang diatas 5000 mg/kgbb. Prosedur pengujian yang dilakukan sama dengan *limit test* 2000. Hanya saja pada *limit test* 5000 apabila terdapat tiga hewan uji tidak menunjukkan mortalitas, maka pemberian dosis dihentikan dan LD₅₀ berada diatas 5000 mg/kgbb. Apabila terdapat tiga hewan uji menunjukkan mortalitas, maka dilakukan *main test* dengan dosis tertinggi 5000 mg/kgbb.

Pembuatan dan Pemberian Sediaan Uji

Sediaan uji diberikan dalam bentuk suspensi. *Suspending agent* yang digunakan adalah *Carboxy methyl cellulose* 1% dengan bantuan *wetting agent* tween 80. Sebelum diberi sediaan uji, hewan dipuasakan selama satu malam. Hewan ditimbang dan volume pemberian disesuaikan dengan berat badan serta dosis hewan.

Modifikasi dilakukan pada jumlah hewan uji yang digunakan. Dua hewan uji ditambahkan sebagai kontrol tanpa perlakuan dan kontrol CMC. Pada masing masing *limit test* ditambah dua ekor hewan uji yang dibedah pada hari pertama dan

hari ketujuh setelah pemberian dosis untuk evaluasi kerusakan ginjal dan hati.

Pengamatan

Pengamatan dilakukan selama 14 hari untuk hewan uji yang tidak menunjukkan mortalitas. Pengamatan yang dilakukan pengamatan kualitatif dan pengamatan kuantitatif.

Pengamatan kuantitatif berupa berat badan, jumlah konsumsi makan, dan jumlah konsumsi minum selama 14 hari. Pengamatan kuantitatif berupa tanda-tanda ketoksikan pada beberapa sistem organ yaitu kulit dan bulu, membran mukosa, sistem respirasi, mata, sistem otonom, sistem sirkulasi, kelakuan hewan uji dan beberapa parameter tambahan seperti diare, letargi, koma dan salivasi.

Penilaian Kerusakan Hati dan Ginjal

Setelah pengamatan 14 hari hewan uji dikorbankan dan diambil organ hati dan ginjalnya. Organ dicuci dengan NaCl fisiologis dan difiksasi dengan BNF 10%. Pembuatan dan pembacaan preparat histologi dilakukan oleh ahli patologi anatomi. Pembacaan preparat dilakukan dengan mikroskop cahaya menggunakan pembesaran 400x.

Adapun sasaran pembacaan organ hati adalah sel hepatosit hati dengan adanya kerusakan berupa nekrosis, degenarasi hidropik dan degenarasi melemak (Swaryana dkk, 2012). Sedangkan sasaran pembacaan pada organ ginjal adalah tubulus konturtur proksimal dengan kerusakan berupa pembentukan *cast*, nekrosis, hilangnya *brush border*, vakuolisasi, dan dilatasi sel (Sadis et al, 2007). Hasil pembacaan kemudian *discoring* menurut penelitian swarayana untuk organ hati dan sadis *et al* untuk organ ginjal.

Analisis Data

Data mortalitas hewan uji kemudian dianalisis dengan software “AoT425” untuk memperoleh nilai LD₅₀. Data perubahan berat badan, konsumsi makan dan minum dianalisis dengan menggunakan uji t berpasangan untuk melihat apakah terjdapat perbedaan signifikan pada masing masing hewan uji setelah dan sebelum pemberian fraksi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pengolahan Sampel dan Ekstraksi

Bahan basah yang diperoleh berjumlah 1011,6 g daun dan 7270,1 g batang. Setelah proses pengeringan simplisia batang yang diperoleh adalah 425,62 g dan simplisia daun yang diperoleh 164 g. Rendemen yang diperoleh adalah 5,85% pada batang dan 16,21% pada daun.

Tabel I. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol dan Fraksi n-Heksan Daun dan Batang Pacar air

Pengujian	Ekstrak Metanol	Fraksi n-heksan
Alkaloid (Reagen Mayer dan Reagen Dragendorf)	Positif (+) ditandai dengan pembentukan endapan putih setelah penambahan reagen mayer dan endapan oranye pada reagen dragendorf	Negatif (-) tidak membentuk endapan
Flavonoid (HCl dan Mg)	Positif (+) ditandai dengan perubahan warna merah	Negatif (-) ditandai dengan perubahan warna hijau
Saponin	Positif (+) membentuk busa	Negatif (-) tidak membentuk busa
Polifenol (FeCl₃)	Positif (+) dengan perubahan warna biru kehitaman	Negatif (-) tidak mengalami perubahan warna
Tanin (Gelatin)	Negatif (-) tidak membentuk endapan	Negatif (-) tidak membentuk endapan
Triterpenoid Steroid (Anhidrida asetat dan asam sulfat pekat)	Positif (+) membentuk warna hijau	Positif (+) membentuk warna hijau

Simplisia yang digunakan adalah 350 gram, menghasilkan 41,98 gram simplisia. Rendemen ekstrak yang diperoleh adalah 11,99%. Ekstrak kental yang dihasilkan berwarna coklat kehitaman. Fraksinasi tiga kali menghasilkan 8,27 gram fraksi. Jumlah ekstrak yang digunakan adalah 23,94 gram sehingga rendemen fraksi n-heksan adalah 33,23%.

Skrining Fitokimia

Hasil skrining dengan uji tabung menunjukkan ekstrak pacar air mengandung senyawa flavonoid, saponin, polifenol, triterpenoid steroid dan alkaloid sedangkan fraksi n-heksan hanya mengandung senyawa triterpenoid steroid. Hasil pengujian sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa ekstrak etanol pacar air memiliki kandungan senyawa alkaloid dan flavonoid (Bole, 2013). Hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa fraksi n-heksan pacar air mengandung senyawa triterpenoid steroid (Adfa, 2007). Senyawa steroid yang terkandung pada pacar air adalah golongan spinasterol (Wang *et al*, 2009), sedangkan berdasarkan kekerabatan genus *impatiens*, pacar air juga dapat mengandung senyawa stigmasterol dan sitosterol (Anwer *et al*, 2012) yang telah diisolasi dari *Impatiens bicolor* ataupun senyawa golongan triterpenoid *impatiprins* dan *impatienoside* yang telah diisolasi dari *Impatiens pritzelli* (Zhou *et al*, 2007) dan *Impatiens sicutifer* (Li *et al*, 2009). Hasil uji fitokimia ditunjukkan pada tabel I.

Limit test 2000

Hasil pengujian menunjukkan hingga pengamatan 14 hari tidak ada hewan uji yang menunjukkan mortalitas. Dari data mortalitas tersebut disimpulkan bahwa nilai LD₅₀ adalah lebih besar dari 2000 mg/kg bb tikus.

Limit test 5000

Hasil pengujian dengan dosis 5000 mg/kg bb juga tidak menunjukkan mortalitas hingga hari ke 14. Dari data mortalitas tersebut disimpulkan bahwa nilai LD₅₀ fraksi n-heksan daun dan batang pacar air adalah lebih besar dari 5000 mg/kg bb. Menurut klasifikasi Loomis, nilai tersebut berada pada rentang toksisitas ringan.

Pengamatan Kualitatif

Data bobot makan menunjukkan satu hewan uji dengan dosis 5000 mg/kg mengalami peningkatan berat makan. Meskipun demikian dua hewan lain dengan dosis yang sama menunjukkan penurunan yang tidak signifikan ($p > 0,05$). Data bobot minum menunjukkan satu hewan uji mengalami konsumsi jumlah minum yang signifikan ($p < 0,05$) pada dosis 5000 mg/kg. Namun pada dua hewan lainnya mengalami penurunan yang tidak signifikan.

Parameter konsumsi makan dan minum merupakan salah satu indikator hewan uji tidak sehat. Kebiasaan makan dan minum dikontrol dari sistem saraf pusat yang dipengaruhi oleh adrenalin dan noradrenalin. Adanya gangguan makan dan minum dapat menggambarkan

Tabel II. Hasil Analisis Data Jumlah Makan dan Minum Sebelum dan Sesudah Pemberian Dengan Uji T Berpasangan dan Uji Wilcoxon(*). Adanya Perubahan Signifikan ($p < 0,05$) ditandai Dengan Tulisan Tebal

Nomor Tikus	Bobot Makan (g)		Jumlah Minum (ml)	
	Sebelum Pemberian	Setelah Pemberian	Sebelum Pemberian	Setelah Pemberian
Tks 1	15,56 ± 4,86	11,84 ± 2,47	20,75 ± 3,59	19,25 ± 3,86
Tks 2	8,68 ± 8,87	6,53 ± 0,37	15,50 ± 5,25	10,87 ± 2,01
Tks 3	11,38 ± 1,60	13,44 ± 1,29	22,80 ± 2,16	24,80 ± 2,94
Tks 4	-	-	36,25 ± 4,11	31,24 ± 4,27
Tks 5	-	-	22,00 ± 5,24	24,60 ± 4,33
Tks 6	9,50 ± 1,82	13,39 ± 1,02	27,60 ± 13,75*	19,00 ± 4,89*
Tks 7	9,45 ± 0,97*	8,40 ± 1,75*	16,60 ± 3,50	21,80 ± 7,52
Tks 8	12,66 ± 0,65	11,11 ± 2,71	27,80 ± 2,58	27,40 ± 6,38
K. Aq	10,79 ± 1,24	9,99 ± 2,66	20,60 ± 7,36 *	18,80 ± 1,78*
K. CMC	9,34 ± 0,56	12,13 ± 1,27	19,40 ± 4,50*	19,20 ± 3,70*
Tks 13	8,97 ± 0,63*	12,13 ± 0,73*	17,20 ± 1,92	17,20 ± 2,86
Tks 14	12,46 ± 0,46*	0,97 ± 1,27*	19,33 ± 4,89	20,33 ± 4,50

Tabel III. Hasil Analisis Data Perubahan Berat Badan Sebelum dan Sesudah Perlakuan Dengan Uji T Berpasangan. Tidak ada Hewan Uji yang Mengalami Perubahan yang Signifikan ($p > 0,05$)

Nomor Tikus	Perubahan Berat Badan (g)	
	Sebelum Pemberian	Setelah Pemberian
Tks 1	5,73 ± 5,66	0,93 ± 2,05
Tks 2	1,00 ± 5,88	0,43 ± 1,33
Tks 3	3,70 ± 2,02	2,45 ± 2,51
Tks 4	3,26 ± 1,26	2,00 ± 0,76
Tks 5	-	-
Tks 6	3,12 ± 5,67	2,98 ± 3,11
Tks 7	1,07 ± 1,50	2,00 ± 4,49
Tks 8	3,00 ± 1,60	2,34 ± 0,15
K. Aq	4,33 ± 2,46	1,03 ± 2,76
K. CMC	-1,00 ± 7,10	4,16 ± 2,93
Tks 13	1,87 ± 1,44	2,50 ± 1,08
Tks 14	1,76 ± 5,64	1,87 ± 1,77

gangguan sistem kedua neurotransmitter tersebut (Toth and Gardiner, 2000). Pada satu hari satu individu tikus dapat mengkonsumsi 10-20 gram perharinya. Dari data diatas disimpulkan bahwa fraksi n-heksan tidak mempengaruhi bobot makan hewan uji dikarenakan perubahan yang terjadi tidak berkelanjutan dan masih berada didalam batas konsumsi normal (Tabel II). Dari hasil uji t berpasangan, tidak ada perbedaan signifikan pada pertumbuhan hewan uji sebelum dan setelah diberi perlakuan. Penurunan berat badan disertai dengan peningkatan berat badan pada hari berikutnya. Penurunan yang tidak melebihi 5% umum terjadi pada hewan disebabkan oleh faktor seperti stress karena perlakuan (Angelina dkk., 2008). Hasil analisis data perubahan berat badan ditunjukkan pada tabel III.

Hasil Pengamatan Kuantitatif

Hasil pengamatan menunjukkan tidak ada perubahan atau gejala toksik yang signifikan. Tikus satu mengalami takikardi pada hari keenam, tikus dua pada hari kelima, tikus tiga pada hari ketiga dan tikus delapan pada hari pertama. Pada tikus empat terjadi kemerahan membran mukosa. Bradipnea terjadi sesaat setelah hewan uji diberi perlakuan hingga 30 menit. Namun pada pengamatan 4 jam, tikus sudah dapat bernafas dengan normal. Dari sistem ekskresi, terjadi perubahan warna feses menjadi kehitaman dari 4 jam setelah pemberian dan normal kembali hingga hari keempat atau kelima.

Beberapa hewan uji mengalami gangguan pernafasan sesaat setelah diberi perlakuan. Dispnea diduga terjadi disebabkan karena akumulasi cairan yang berlebihan pada saluran nafas dikarenakan pemberian fraksi yang cukup

kental. Dari pengamatan disimpulkan bahwa efek takikardi yang disebabkan tidak terpengaruhi oleh dosis. Artinya dengan peningkatan dosis tidak terjadi efek takikardi pada ketiga ekor tikus yang diberi dosis 5000 mg/kg. Peningkatan dosis pada tikus delapan diduga disebabkan stress dan tingginya aktivitas ketika diberikan pemberian.

Takikardi yang disebabkan juga tidak terjadi pada hari kedua sehingga disimpulkan bahwa pemberian ekstrak belum memberikan efek yang signifikan terhadap sistem sirkulasi hewan uji hingga dosis 5000 mg/kg. Feses normal dari tikus yang teramati adalah coklat dan diduga perubahan warna tersebut menggambarkan bahwa senyawa yang diberikan langsung dieskresikan oleh hewan uji melalui feses. Menurut literatur, senyawa xenobiotik yang cepat dieskresikan dari tubuh relatif tidak toksik karena zat tersebut akan sulit mencapai kadar toksik minimal, hal ini sesuai dengan hasil perhitungan bahwa LD₅₀ fraksi n-heksan berada pada kategori toksik ringan dan sedang (Priyanto, 2010). Feses kembali normal pada hari ketiga ataupun keempat setelah pemberian.

Derajat Kerusakan Organ Hati

Pada dosis 2000 mg/kg menyebabkan lesi setempat pada hewan uji berupa lesi degenerasi hidropik. Pada dosis 5000 mg/kg, degenerasi hidropik terjadi namun tidak separah dosis 2000 mg/kg dan tidak mencapai *score* 1. Dosis 2000 mg/kg pada hari ketujuh menyebabkan degenerasi hidropik paling tinggi. Contoh pengamatan sel hepatosit dapat dilihat pada gambar 1.

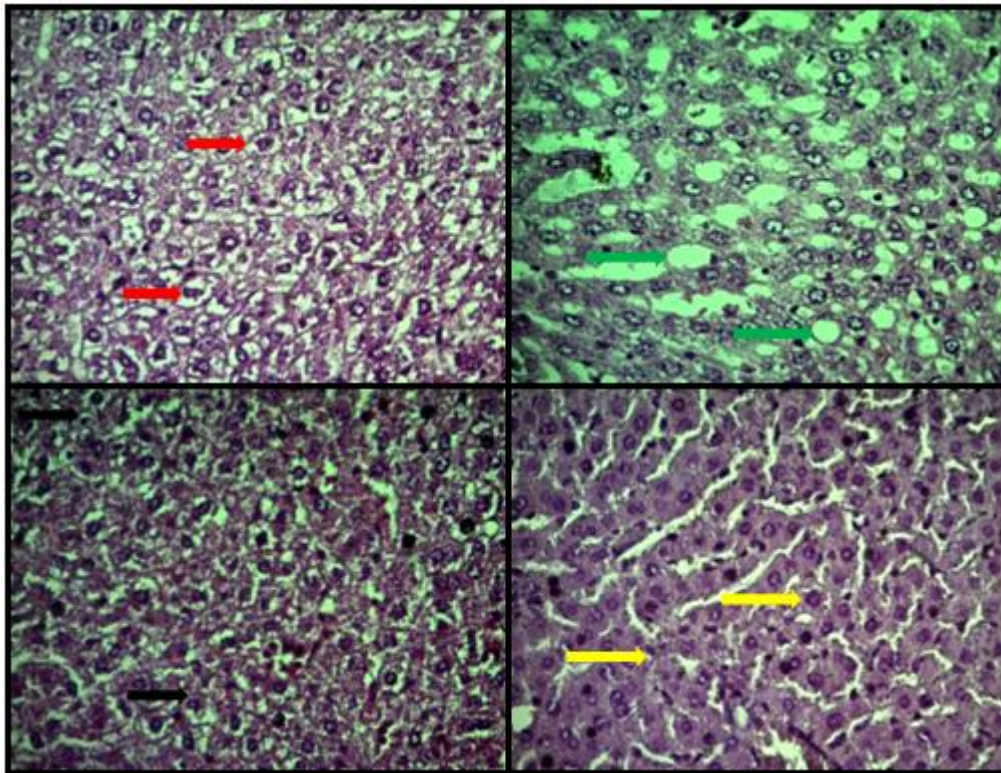
Degenerasi hidropik ditandai dengan pembengkakan sel. Inti sel berada pada ruang kosong dikarenakan hilangnya sitoplasma. Pembengkakan sel dikarenakan akumulasi air di dalam sel yang dapat terjadi dikarenakan rusaknya organela mitokondria ataupun rusaknya membran plasma (William *et al*, 2000). Kerusakan membran plasma diduga terjadi karena kandungan fitosterol dalam fraksi n-heksan. Fitosterol dapat menggantikan posisi kolesterol dalam struktur membran sel sehingga mengganggu fungsi membran untuk menjaga keseimbangan cairan intrasel (Xu *et al*, 2012). Kerusakan yang terjadi tidak bergantung dosis diduga karena kandungan triterpenoid pada fraksi n-heksan. Adanya kerusakan yang disebabkan senyawa fitosterol diduga dapat dicegah ataupun diperbaiki oleh keberadaan senyawa triterpenoid pentasiklik. Contoh triterpenoid yang dapat bersifat hepatoprotektif adalah asam oleat dan ursolik (Liu, 1995).

Derajat Kerusakan Organ Ginjal

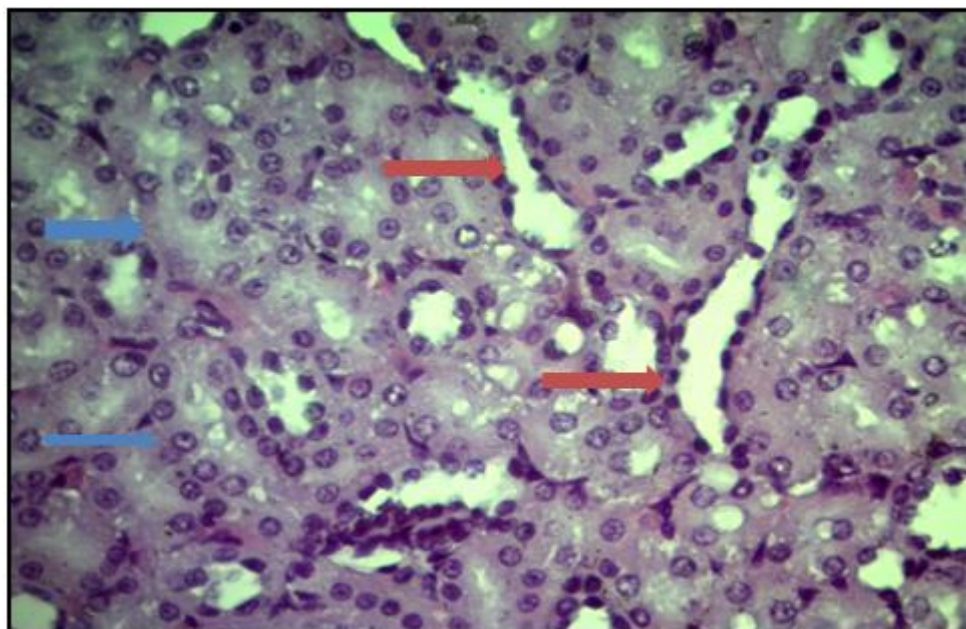
Hasil pengamatan menunjukkan adanya kerusakan berupa hilangnya *brush border* pada semua hewan uji termasuk tikus kontrol. Meskipun demikian, pemberian dosis memperparah rusaknya ginjal. Hal ini dibuktikan dengan peningkatan jumlah sel tubulus proksimal yang lebih banyak rusak pada dosis 2000 mg/kg dan 5000 mg/kg baik pada hari pertama hingga hari keempat belas. Kerusakan terbesar terjadi pada dosis 5000 mg/kg pada hari ketujuh. Contoh pengamatan sel tubulus proksimal ginjal dapat dilihat pada gambar 2.

Brush border merupakan *microvilli* yang terdapat pada sel tubulus proksimal ginjal. Kehilangan *brush border* menandakan adanya luka pada sel yang menyebabkan gangguan integritas dan polaritas sel epitel tubulus proksimal (Boventre, 2010). Sel renal apabila terdapat dalam kondisi lingkungan yang tidak baik akan mengaktifasi transduksi sinyal untuk mengekspresikan beberapa gen. Lingkungan yang tidak baik meliputi salah satunya iskemia ataupun adanya radiasi, oksidan (radikal bebas), dan hipertonisitas (De Broe *et al*, 2003). Stress oksidatif dapat terjadi pada hewan sehingga terjadi kerusakan pada tubulus ginjal. Stress oksidatif dapat terjadi ketika didalam tubuh terdapat banyak radikal bebas yang tidak dapat diimbangi dengan antioksidan yang ada. Radikal bebas tersebut dapat berasal dari internal hewan uji yaitu sebagai hasil samping dari pembentukan ATP di mitokondria ataupun hasil samping dari proses fagositosis oleh sel imun. Selain itu, radikal bebas eksternal juga dapat masuk sehingga meningkatkan tingkat kerusakan ginjal seperti gas nitrogen oksida, peroksida dan sulfur dioksida (Priyanto, 2010).

Kerusakan pada tubulus proksimal diperparah dengan pemberian fraksi. Hal ini ditunjukkan dengan peningkatan derajat kerusakan apabila dibandingkan pada akuadest. Tikus yang diberi akuadest mengalami kerusakan tingkat dua, namun hewan yang diberikan fraksi mengalami kerusakan tingkat tiga dan meningkat kerusakannya ketika diberikan peningkatan dosis yaitu dosis 5000 mg/kg dengan kerusakan mencapai tingkat empat. Oleh sebab itu, disimpulkan pemberian dosis dapat memperparah kerusakan pada tubulus ginjal. Peningkatan dosis dapat menyebabkan kerusakan yang lebih parah diduga karena kemampuan ginjal mempertahankan fungsinya didalam tubuh diperparah dengan kehadiran fraksi. Beberapa penelitian melaporkan bahwa keberadaan fitosterol didalam darah dapat menurunkan



Gambar 1. Pengamatan Histopatologi Sel Hepatosit Dengan Perbesaran 400x. Sel Hepatosit Normal Ditunjukkan Dengan Panah Kuning (→), Degenarasi Lemak Ditunjukkan Dengan Panah Hijau (→), Degenarasi Hidropik, Ditunjukkan Dengan Panah Merah (→) dan Nekrosis Ditunjukkan Dengan Panah Hitam (→).



Gambar 2 Pengamatan Histologi Sel Tubulus Proksimal Ginjal. Sel Normal Ditunjukkan dengan Panah Biru (→), Dengan Penampakan Sitoplasma Tebal. Sel yang Kehilangan *Brush Border* Ditunjukkan dengan Panah Merah (→).

konsentrasi antioksidan larut lemak dalam tubuh (Brufau *et al*, 2008). Adanya kerusakan yang telah terjadi diperparah dengan tidak hadirnya antioksidan untuk mencegah pembetukan radikal bebas yang berlanjut. Meskipun belum ada bukti mekanisme yang jelas bagaimana fitosterol menurunkan kadar antioksidan tubuh, namun hal ini dapat menjadi salah satu faktor penyebab kerusakan yang bertambah pada tubulus proksimal setelah pemberian fraksi.

Pengujian toksisitas akut meliputi penentuan LD₅₀ dan ciri-ciri ketoksikan yang akan terjadi. Dari hasil pengujian nilai LD₅₀ fraksi n-heksan daun dan batang pacar air berada diatas 5000 mg/kg berat badan hewan uji. Apabila dikonversikan kedalam dosis manusia dengan dikalikan faktor pengali 11,2 maka LD₅₀ fraksi n-heksan pacar air untuk manusia yang berkisar 70 kg adalah 56 gram atau diatas 0,5 gram/kilogram berat badan manusia. Menurut klasifikasi loomis, fraksi n-heksan tanaman pacar air berada pada rentang toksik ringan (Priyanto, 2010). Hasil nilai LD₅₀ juga didukung dengan penelitian sebelumnya bahwa ekstrak etanol pacar air memiliki nilai LD₅₀ diatas 2000mg/kg berat badan hewan uji (Baskar, 2012).

Hasil pengujian menunjukkan tanaman pacar air positif mengandung senyawa triterpenoid dan steroid. Triterpenoid pentasiklik telah dianggap sebagai senyawa nontoksik. Pemberian campuran komponen triterpenoid berupa botulin, asam botulin, asam oleanolat dan lupeol tidak memberikan efek toksik. Hal tersebut juga didukung dengan LD₅₀ oral asam oleanolat adalah 1500 mg/ml pada mencit. Pemberian dosis tinggi pada tikus baik asam betulinat dan asam oleanolat tidak memberikan efek toksik pada tikus (Laszyck, 2009). Selain itu, senyawa sterol seperti *stigmasterol*, *campesterol* memiliki tingkat keamanan yang tinggi. Menurut literatur, senyawa tersebut telah digunakan sebagai senyawa pemberi nutrisi dengan dosis 2gr/hari. Meskipun demikian, fitosterol harus dibatasi hingga 8,6 gram/hari untuk menghindari efek yang tidak diinginkan (Brufau *et al*, 2008). Dari uraian diatas, dapat disimpulkan bahwa kandungan n-heksan pacar air yaitu golongan steroid dan triterpenoid memiliki LD₅₀ yang tinggi.

KESIMPULAN

Fraksi n-heksan daun dan batang pacar air termasuk kedalam kategori toksik ringan dengan LD₅₀ lebih besar dari 5000 mg/kg berat badan tikus. Fraksi n-heksan daun dan batang pacar air tidak memberikan efek toksik pada hewan uji hingga dosis 5000 mg/kg berat badan hewan uji. Sistem organ yang diduga akan mengalami

gangguan pada dosis diatas 5000 mg/kg adalah organ hati dan organ ginjal.

DAFTAR PUSTAKA

- Adfa M. 2007. Senyawa Antibakteri Dari Daun Pacar Air (*Impatiens balsamina* L.). *Jurnal Gradien*. 4(1): 318-322.
- Angelina M, Hartati S, Dewijanti ID, Banjarnahor SDS, Meilawati L. 2008. Penentuan LD₅₀ Daun Cinco (*Cyclea barbata* Miers.) Pada Mencit. *Makara Sains*. 12(1): 23-26.
- Anwer N, Waqar MA, Iqbal M, Mushtaq M, Sobia A. 2012. Phytochemical Analysis, Free Radical Scavengin Capacity and Antimicrobial Properties of *Impatiens bicolor* Plant. *IFRJ*. 20(1): 99-103.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2010. Apakah Produk Herbal Yang Anda Konsumsi Aman, Bermutu dan Bermanfaat. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan. Juli – Agustus 2010; XI(4): 2-3.
- Baskar N, Devi BP, Jayakar B. 2012. Anticancer Studies on Ethanol Extract of *Impatiens Balsamina*. *International Journal of Research in Ayuverda & Pharmacy*. 3(4), Jul-Aug 2012.
- Boventre JV. 2010. *Mechanisms of Acute Kidney Injury and Repair*. Dalam A Jorres et al. Management of Acute Kidney Problems. Berlin: Springer-Verlag. Hal 14.
- Bole S, Shivakumara, Wahengbam SS, Rana NK, Kundu S, Dubey S. 2013. Phytochemical Screening and Biological Activities of *Impatiens balsamina* L. *WJPS*. Vol 2 (6).
- Brufau G, Canel MA, Rafecas M. 2008 Phytosterol : Physiologic and Metabolic Aspects Related to Cholesterol-Lowering Properties. *Elsevier*. 28: 217-225.
- Debashree N, A Subhalakshmi, S Rita, dan A Pfuzia. 2013. Study of Analgesic and Anti-inflammatory Effects of *Impatiens balsamina* leaves in albino Rats. *Int J Pharm Bio Sci*. 4(2): 581-587.
- De Broe ME, Porter GA, Bennet WM, Verpooten GA. 2003. *Clinical Nephrotoxins: Renal Injury from Drugs and Chemicals*. Second Edition. London : Kluwer Academic Publishers. Hal: 65;71-72.
- Dewoto HR. 2007. Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 2007; 57 (7): 205-211.
- Laszyck MN. 2009. Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy. *Planta Med*. 75: 1549-1560.
- Li Wei, Bi Xue-Yan, Wang Kun, Li DongXia, Satou Ta, Koike K. 2009. Triterpenoid Saponin

- from *Impatiens sicutifer*. *Phytochem.* 70 : 816-821.
- Liu J. 1995. Pharmacology of Oleanolic Acid and Ursolic Acid. *Journal of Ethnopharmacology.* 49, 57-68.
- Organization for Economic Co-operation and Development. 2008. OECD Guideline for Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity-Up-and-Down-Procedure (UDP), 425. Adopted 3rd October, 2008.
- Patocka J. 2003. Biologically Active Pentacyclic Triterpens and Their Current Medicine Signification. *J Appl Biomed.*
- Priyanto. 2010. *Toksikologi*. Jakarta: Penerbit Leskonfi.
- Sadis C, Teske G, Stokman G, Kubjak G, Cleassen N. 2007. Nicotine Protect Kidney From Renal Ischemia/Reperfusion Injury Through the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. *Journal of Plos ONE.*
- Siswoyo P. 2004. *Alternatif Obat Dengan Tumbuhan Alami : Tumbuhan Berkhasiat Obat*. Yogyakarta : Penerbit Absolut.
- Swaryana I, I Wayan, Ketut B. 2012. Perubahan Histopatologi Mencit (*Mus musculus*) yang diberikan ekstrak daun *Asgelica keisei*. *Buletin Udayana.* 2: 119-125.
- Toth, LA, Gardiner TW. 2000. Food and Restriction Protocols: Physiological and Behavioral Considerations. *Contemporary Topic AALAS.* 39 (6).
- Wang Yuang-Cheun, Li Wan-Yu, Wu Deng-Chyang, Wang Jeh-Jeng, Wu Cheng-Hsun, Liao Jyun-ju *et al.* 2009. In Vitro Activity of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone and Stigmasta-7,22-diene- 3 β -ol from *Impatiens balsamina* L. against Multiple Antibiotic-Resistant *Helicobacter pylori*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Vol 2011.
- William PL, James RC, Roberts SM, editor. 2000. *Principle of Toxicology* : Second Edition. New York: John Wiley & Sons. Hal : 116;137.
- Xu Zhidong, Harvey KA, Pavlina T, Dutot G, Hise M Zaloga GP. 2012. Steroidal Compounds in Commercial Parenteral Lipid Emulsion. *Nutrients.* 4, 904-921.
- Zhou X-F, Zhao X-Y, Tang L, Ruan H-L, Zhang T-H, Pi H-F,et al. 2007. Three New Triterpenoid Saponins from the Rhizomes of *Impatiens pritzellii* var. *hupehensis*. *Journal of Asian Natural Producers Research.* Vol. 9(4); 379-385