

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL 96%
DAUN PASIR-PASIR (*Ilex cymosa* BLUME)
PADA TIKUS BETINA GALUR WISTAR**

NASKAH PUBLIKASI



**Oleh:
DINI SEPKAWILA CATURIZANI
NIM. I22111033**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK
2016**

NASKAH PUBLIKASI

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL 96%
DAUN PASIR-PASIR (*Ilex cymosa* Blume)
PADA TIKUS BETINA GALUR WISTAR**

Oleh:

Dini Sepkawila Caturizani

I 22111033

**Telah dipertahankan terhadap Tim Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura**

Disetujui :

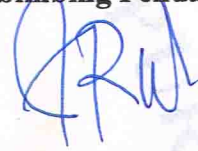
Pembimbing Utama,



Inarah Fajriaty, M.Si., Apt

NIP. 198004072009122002

Pembimbing Pendamping,



Rafika Sari, M.Farm., Apt

NIP. 198401162008012002

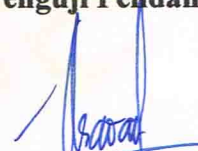
Penguji Utama,



Robiyanto, M. PharmSc., Apt

NIP. 198212192008011005

Penguji Pendamping,



Nera Umilia Purwanti, M.Sc., Apt

NIP. 198102242008122003

**Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura**



dr. Arif Wicaksono, M.Biomed

NIP. 198310302008121002

**Lulus Tanggal : 21 Juni 2016
No. SK Dekan FK : 4017/UN22.9/DK/2016
Tanggal : 17 Juni 2016**

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTAK ETANOL 96% DAUN PASIR-PASIR
(*Ilex cymosa* BLUME) PADA TIKUS BETINA GALUR WISTAR**

Dini Sepkawila Caturizani¹, Inarah Fajriaty¹, Rafika Sari¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura

Korespondensi E-mail : dinisepkawila@gmail.com

ABSTRAK

Tanaman pasir-pasir (*Ilex cymosa* Blume) atau sering disebut dengan “Kambasirak” merupakan salah satu tanaman yang secara empiris digunakan oleh masyarakat Dayak Ngaju sebagai obat diare, namun belum tersedia standar keamanan untuk penggunaan secara oral. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas akut ekstrak etanol 96% daun pasir-pasir sehingga dapat dijadikan acuan untuk penggunaan terapi yang aman. 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* ekstrak etanol daun pasir-pasir pada dosis 2000 mg/Kg berat badan tikus tidak menunjukkan adanya tanda-tanda ketoksikan maupun gejala kematian, namun pada dosis 5000 mg/kg berat badan tikus menunjukkan adanya gejala ketoksikan berupa perbedaan bobot badan yang signifikan, tetapi tidak menunjukkan adanya gejala kematian. Pengamatan selama 14 hari tidak menunjukkan adanya tanda-tanda ketoksikan dan gejala kematian pada dosis 2000 mg/Kg berat badan tikus maupun pada dosis 5000 mg/Kg berat badan tikus. Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan LD₅₀ ekstrak etanol daun pasir-pasir lebih dari 5000 mg/KgBB dan berada dalam kategori praktis tidak toksik.

Kata Kunci : ekstrak etanol daun pasir-pasir, *Ilex cymosa*, OECD 425, toksisitas akut

ACUTE TOXICITY EVALUATION OF EXTRACT ETHANOL 96% *PASIR-PASIR* (*ilex cymosa* BLUME) LEAF ON RATS FEMALE WISTAR

Dini Sepkawila Caturizani¹, Inarah Fajriaty¹, Rafika Sari¹
¹Pharmacy Department, Faculty of Medicine, Tanjungpura University
E-mail Correspondence: dinisepkawila@gmail.com

Pasir-pasir plant (*ilex cymosa* Blume) or atau often called “*kambasirak*” is one of the plants that empirically used in “Dayak Ngaju” society as diarrhea medicine, but there is no safety standart to be used orally. This research purpose is to find out the acute toxicity ethanol extract 96% to the *pasir-pasir* leaves so it can be used as a reference for the safe therapeutic use. Acute toxicity test conducted by using method adopted from OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) number 425: *Acute Oral Toxicity (Up and Down Procedure)*. The ethanol extract *pasir-pasir* leaves *Limit Test* result in 2000 mg/Kg rat weight dosage shows neither signs of toxicity nor the sign of the death, but as the dosage risen to 5000 mg/Kg rat weight shows the difference in body weight sign of toxicity but no sign of death. The 14 days observation also shows no toxic sign or death neither in 2000 mg/Kg rat weight nor 5000 mg/Kg rat weight. The conclusion of this research shows that the toxic level of ethanol extract in the *pasir-pasir* leaves is more than 5000 mg/Kg body weight and in the category of practically non toxic.

Keywords: *pasir-pasir* leaves ethanol extract, *Ilex cymosa*, OECD 425, acute toxicity

PENDAHULUAN

Indonesia dikenal sebagai salah satu negara yang mempunyai keanekaragaman hayati berupa tumbuhan yang banyak digunakan sebagai obat tradisional, tetapi penelitian untuk mengevaluasi tingkat keamanannya belum banyak dilakukan. Sedangkan pengetahuan tentang potensi efek toksik yang ada dalam tumbuhan obat adalah penting untuk menjamin keamanan dalam penggunaannya. WHO (*World Health Organization*) menetapkan standar mutu dari obat tradisional harus memenuhi beberapa persyaratan meliputi kualitas, keamanan, dan khasiat. Untuk memenuhi persyaratan tersebut diperlukan upaya penegasan keamanan melalui uji praklinik yang meliputi uji ketoksikan dan khasiat kerja. Salah satu pengujian yang harus dilakukan adalah pengujian toksisitas^[1].

Salah satu tanaman yang dapat digunakan masyarakat sebagai obat tradisional adalah tanaman Pasir-Pasir atau dikenal dengan Kambasirak (*Ilex cymosa* Blume). Berdasarkan hasil penelitian terkini, secara empiris kambarsiak digunakan oleh masyarakat Dayak Ngaju di Kalimantan Tengah sebagai obat untuk mengobati diare, untuk menggosok kudis dan sebagai obat luka^[2]. Dari hasil penelitian yang sebelumnya, dinyatakan bahwa saponin merupakan kandungan utama dari genus *Ilex*^[3-6].

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Pasquali et al. (2011) menunjukkan bahwa terdapat efek toksik pada *I. paraguariensis* dimana tanaman ini memiliki genus yang sama yaitu *ilex*. *I. paraguariensis* memiliki potensi toksisitas akut karena adanya sel tumor di wilayah korteks ginjal pada kelompok perlakuan. Hal ini juga diamati bahwa perlakuan mampu menghambat penerimaan neutrofil dalam sirkulasi darah, dengan demikian membuktikan efek anti-inflamasi untuk ekstrak *I. Paraguariensis* ^[7].

Penelitian mengenai data keamanan dari tanaman *ilex cymosa* masih belum ditemukan, sedangkan pemanfaatannya di masyarakat telah banyak dilakukan. Oleh sebab itu perlu dilakukan pengujian lebih lanjut pada hewan uji untuk melihat ada tidaknya efek toksik untuk menjamin keamanan penggunaannya. Uji toksisitas akut merupakan uji toksisitas yang dilakukan secara *in vivo* sebagai salah satu uji pra klinik. Uji ini dilakukan untuk mengukur derajat efek toksik setelah pemberian suatu senyawa dosis tunggal dalam rentang waktu 24 jam. Suatu bahan alam baru harus melewati uji toksisitas akut untuk bisa dikonsumsi secara aman^[8]. Hasil dari penelitian yang dilakukan diharapkan dapat memberikan informasi terkait penggunaan dosis yang tepat saat membuat sediaan yang berasal dari ekstrak etanol daun Pasir-Pasir dan dapat mengenali tanda-tanda toksik apabila terjadi kedepannya.

METODOLOGI

Bahan-bahan yang digunakan adalah simplisia daun pasir-pasir, pelarut ekstraksi yaitu etanol 96%, *Carboxy methyl cellulose* (CMC), dan reagen skrinning fitokimia. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, 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 *wistar*. Sampel diperoleh secara random yang memenuhi kriteria inklusi yaitu tikus putih betina galur *wistar*, umur 2-3 bulan, berat badan 110-200 gram, tidak hamil dan sehat.

Pengambilan dan Pengolahan Sampel.

Sampel tanaman pasir-pasir diambil dari area pemakaman pahlawan Kecamatan Mandor, Pontianak, Provinsi Kalimantan Barat. Daun dirajang dan dipotong kecil-kecil. Daun yang telah diubah ukurannya, dikering anginkan menggunakan lemari pengering dengan suhu 37°C. Daun kering didesintegrasi dengan blender kemudian diayak dengan pengayak 40 mesh.

Proses Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan secara maserasi. Simplisia daun dimasukkan ke dalam bejana kaca, kemudian dituangi dan direndam dengan penyari etanol 96%, 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 etanol kental kemudian diencerkan lagi dengan pelarut masing-masing dan dilakukan uji skrinning fitokimia dengan uji tabung terhadap senyawa alkaloid, tanin, flavonoid, polifenol, saponin dan triterpenoid steroid.

Pengujian Pola Kromatogram secara Kromatografi Lapis Tipis

Fase gerak yang digunakan adalah n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 3 : 1 yang bersifat non polar dan fase diam yang digunakan yaitu silika gel F254. Penampak bercak yang digunakan yaitu H₂SO₄ 10%. Pemisahan senyawa membentuk pola kromatogram diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Hasil dari Uji ini ditunjukkan dengan terbentuknya pola sidik jari tanaman pada plat KLT yang di amati dibawah sinar UV 245 nm dan 366 nm.

Uji Toksisitas Akut.

Uji toksisitas akut dilakukan berdasarkan pedoman OECD 425 :*Acute Oral Toxicity Up and Down Procedure*^[9].

a. Main Test

Uji utama (*main test*) dilakukan dengan memperhatikan tingkat dosis dimana terjadi kematian pada uji pendahuluan. Satu hewan uji diberi dosis. Apabila setelah pengamatan 4 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 *Limit Test* 5000. Apabila tiga atau lebih hewan uji yang hidup maka LD50 dari sampel adalah lebih besar dari 2000 mg/KgBB.

b. Limit Test

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%. Sebelum diberi sediaan uji, hewan dipuasakan selama satu malam. Hewan ditimbang dan volume pemberian disesuaikan dengan berat badan serta dosis hewan.

Pengamatan hewan uji

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. 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 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 data skema berat badan melihat apakah terdapat perbedaan signifikan pada masing masing hewan uji setelah dan sebelum pemberian sediaan uji.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pengolahan Sampel dan Ekstraksi

Setelah proses pengeringan yang diperoleh serbuk simplisia berjumlah 300 gram daun. Rendemen ekstrak yang diperoleh adalah 12,02%. Ekstrak kental yang dihasilkan berwarna hijau kehitaman.

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Pasir-Pasir

No	Golongan Kimia	Senyawa	Ekstrak Etanol Daun Pasir-Pasir (<i>Ilex cymosa</i> Blume)	Keterangan
1	Alkaloid		(+)	endapan putih kekuningan
2	Flavonoid		(+)	warna merah sampai jingga
3	Fenol		(+)	warna hijau kebiruan
4	Steroid		(+)	warna jingga
5	Tanin		(+)	terbentuk endapan
6	Saponin		(+)	busa ± 1 cm

Skrining Fitokimia

Hasil skrining dengan uji tabung menunjukkan ekstrak pasir-pasir mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, steroid, tanin, dan sponin. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada Tabel.1.

Pemeriksaan Pola Kromatogram Secara Kromatografi Lapis Tipis

Hasil pemeriksaan pola kromatogram secara kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun pasir-pasir memiliki kandungan senyawa yang dapat di lihat pada gambar 1.



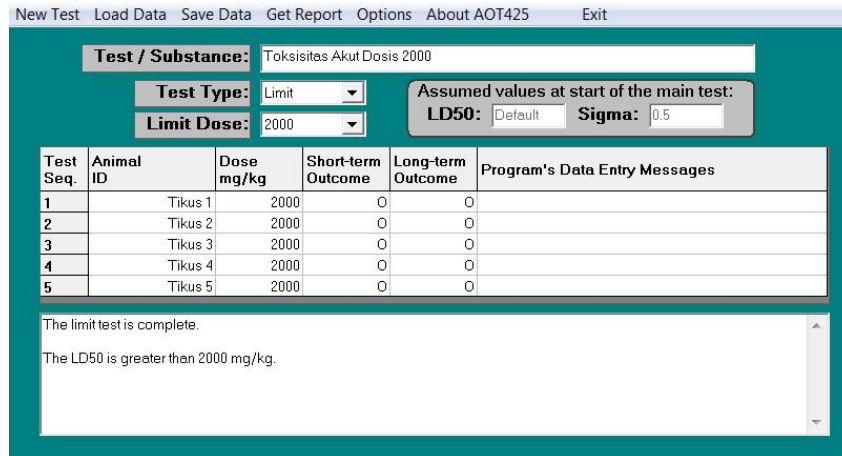
Gambar 1. Pola kromatogram tanaman pada sinar UV 254 nm dan sinar UV 366 nm

Uji Toksisitas Akut

Sebelum dilakukan pengujian sediaan pada hewan uji, dilakukan uji perilaku pada hewan uji. Pengamatan yang dilakukan berupa *platform*, aktivitas motorik, *straub*, *piloereksi*, *ptiosis*, *refleks pineal*, *refleks kornea*, *lakrimasi*, *katalepsi*, perubahan sikap tubuh, menggelayut, *retobilismen*, *fleksi*, *hafner*, mortalitas, *grooming*, *defekasi*, *urinasi*, perubahan irama pernafasan,

salivasi, tremor, kejang dan *writhing*. Dilakukan uji perilaku adalah untuk mengetahui apakah sediaan kita memberikan pengaruh terhadap perilaku hewan uji.

Limit test 2000 Hasil pengujian terhadap 5 ekor tikus hingga pengamatan 14 hari menunjukkan tidak ada hewan uji yang menunjukkan mortalitas sehingga disimpulkan bahwa nilai LD50 adalah lebih besar dari 2000 mg/KgBB tikus.



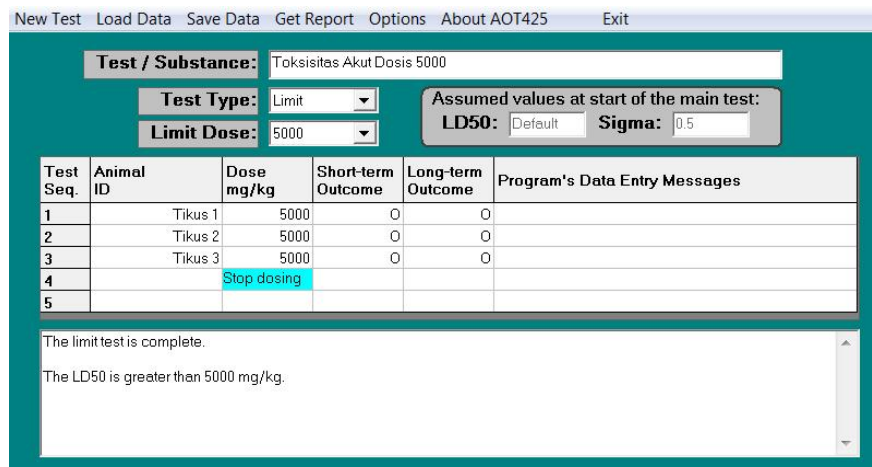
Test Seq.	Animal ID	Dose mg/kg	Short-term Outcome	Long-term Outcome	Program's Data Entry Messages
1	Tikus 1	2000	0	0	
2	Tikus 2	2000	0	0	
3	Tikus 3	2000	0	0	
4	Tikus 4	2000	0	0	
5	Tikus 5	2000	0	0	

The limit test is complete.
The LD50 is greater than 2000 mg/kg.

Gambar 2. Pengujian Toksisitas Akut Dosis 2000 mg/KgBB

Pengamatan diperoleh bahwa tikus beraktivitas seperti pada saat sebelum diberikan ekstrak (menit ke-0). Setelah 24 jam, tikus pada pemberian dosis 2000 mg/KgBB tidak menunjukan adanya kematian ataupun tanda-tanda toksisitas. Hal ini menunjukan bahwa pada dosis 2000 mg/kgBB tidak menimbulkan kematian atau tanda-tanda ketoksikan pada tikus betina.

Limit test 5000 Hasil pengujian dengan dosis 5000 mg/KgBB pada 3 ekor tikus juga tidak menunjukkan mortalitas hingga hari ke 14. Dari data mortalitas tersebut disimpulkan bahwa nilai LD50 ekstrak etanol daun pasir-pasir adalah lebih besar dari 5000 mg/KgBB.

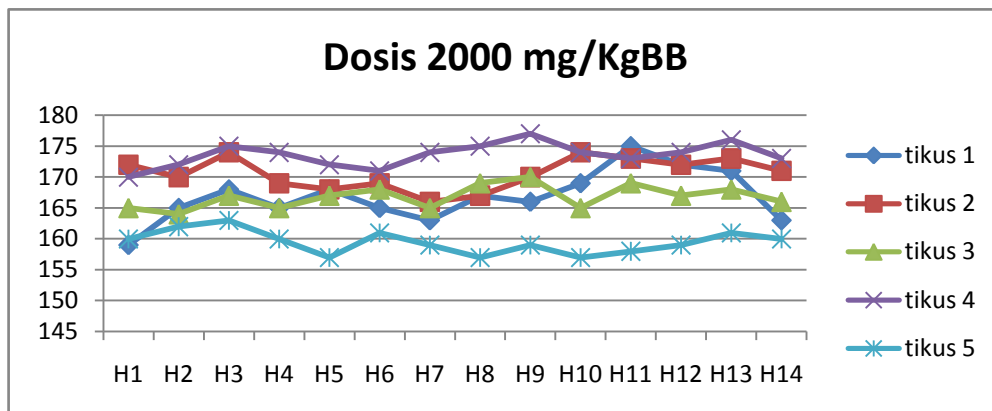


Test Seq.	Animal ID	Dose mg/kg	Short-term Outcome	Long-term Outcome	Program's Data Entry Messages
1	Tikus 1	5000	0	0	
2	Tikus 2	5000	0	0	
3	Tikus 3	5000	0	0	
4		Stop dosing			
5					

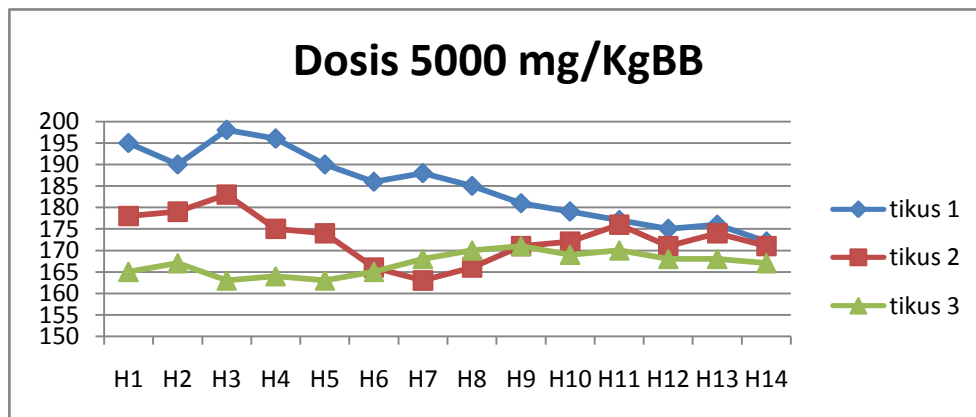
The limit test is complete.
The LD50 is greater than 5000 mg/kg.

Gambar 3. Pengujian Toksisitas Akut Dosis 5000 mg/kgBB

Perlakuan kedua dilakukan pada satu tikus betina dengan dosis 5000 mg/KgBB yang juga telah dipuasakan selama 3-4 jam dengan tetap diberikan minum. Dalam pengamatan 24 jam. Pada hari berikutnya tikus berikutnya diberi dosis yang sama (5000 mg/KgBB) pada dua ekor tikus dan dilakukan pengamatan selama 24 jam. Ketiga tikus tersebut mengalami salivasi dan urinasi pada jam 0,5 dan 1, pada jam selanjutnya tidak menunjukkan tanda-tanda toksik. Namun, pada pengamatan 24 jam tidak terjadi adanya kematian pada ketiga tikus. Dari hal ini dapat disimpulkan bahwa pada dosis 5000 mg/KgBB tidak menyebabkan kematian, namun menumbulkan tanda-tanda ketoksikan pada tikus betina. Pengamatan dilanjutkan selama 14 hari untuk melihat adanya kematian dan terjadinya perubahan bobot badan pada tikus. Kelompok dosis 2000 mg/KgBB menunjukkan tidak adanya kematian yang terjadi pada hari keempat belas, sedangkan untuk bobot badan pemberian sediaan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan atau perkembangan bobot badan tikus. Hal yang sama terjadi pada kelompok dosis 5000 mg/KgBB sedangkan pada bobot badan mengalami penurunan berat badan pada hari ke 6 pada tikus 1 dan pada hari ke 7 pada tikus 2. Hal ini dapat dilihat pada grafik perubahan bobot badan tikus sampai hari keempat belas tidak menunjukkan adanya kematian yang terjadi. Dapat diketahui bahwa ekstrak etanol daun pasir-pasir termasuk ke dalam kategori relatif tidak toksik.



Gambar 4. Grafik perubahan bobot badan pada dosis 2000 mg/KgBB

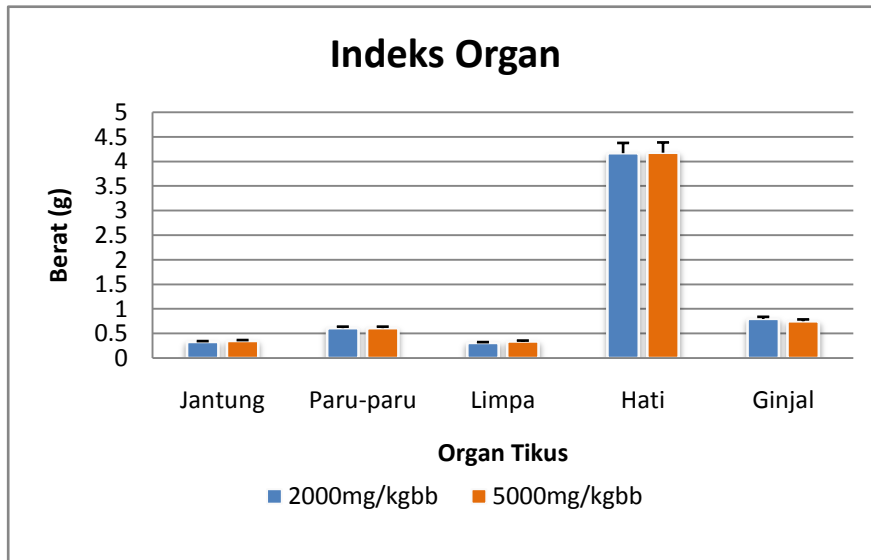


Gambar 5. grafik perubahan bobot badan pada dosis 5000 mg/KgBB

Pengamatan dilanjutkan pada hari kelima belas dengan dilakukan pembedahan terhadap hewan coba untuk melihat indeks organ tikus yang telah diberi sediaan secara oral. Hal ini dilakukan untuk mengamati perubahan yang terjadi pada organ jantung, paru-paru, limpa, hati, dan ginjal secara makroskopik akibat pemberian ekstrak etanol daun pasir-pasir.

Tabel 2. Hasil pengamatan indeks organ pada kelompok dosis 2000 mg/KgBB dan 5000mg/KgBB

Kelompok Perlakuan	Indeks Organ (g)				
	Jantung	Paru-paru	Limpa	Hati	Ginjal
2000mg/kgbb	0,29±0,003	0,58±0,008	0,39±0,03	5,78±0,42	0,81±0,02
5000mg/kgbb	0,38±0,02	0,95±0,13	0,52±0,01	5,26±0,13	0,81±0,05



Gambar 6. Grafik indeks Organ

Hasil pengamatan indeks organ jantung, paru-paru, limpa, hati, dan ginjal menunjukkan bahwa tidak terjadinya pembesaran organ yang berarti pada tiap tikus yang berada pada kelompok dosis 2000 mg/KgBB dan 5000 mg/KgBB.

KESIMPULAN

Pemberian dosis 2000 mg/KgBB ekstrak etanol daun pasir-pasir (*Ilex cymosa* Blume) tidak memberikan perubahan perilaku, psikomotor, dan indeks organ pada tikus, namun pada dosis 5000 mg/KgBB terjadi penurunan nilai berat badan yang signifikan, tetapi tidak menimbulkan pengaruh pada indeks organ tikus. Ekstrak etanol daun pasir-pasir (*Ilex cymosa* Blume) memiliki nilai toksisitas akut (LD₅₀) lebih besar dari 5000 mg/KgBB yang berarti masuk dalam kategori praktis tidak toksik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Depkes RI. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan; 2000.
2. Setyowati. F. M dkk, Etnobotani Masyarakat Dayak Ngaju Di Daerah Timpah Kalimantan Tengah. 2005
3. Ouyang, M.; Wang, H.; Chen, Z.; Yang, C. Triterpenoid Glycosides from *Ilex kudincha*. *Phytochemistry*, 1996, *43*, 443-445.
4. Taketa, A.T.C.; Schalanger, T.S.; Guillaume, D.; Gosmann, G.; Schenkel, E.P. Triterpenoid Glycosides and a Triterpene from *Ilex brevicuspis*. *Phytochemistry*, 2000, *53*, 901-904.
5. Ouyang, M.A.; Liu, Y.Q.; Wang, H.Q.; Yang, C.R. Triterpenoid Saponin From *Ilex latifolia*. *Phytochemistry*, 1998, *49*, 2483-2486.
6. Pires, V.S.; Guillaume, D.; Gosmann, G.; Schenkel, E.P. Saponin From *Ilex dumosa*, an Erva-maté (*Ilex paraguariensis*) Adulterating Plant. *J. Agr. Food Chem.*, 1997, *45*, 1027-1031.
7. Pasquali et.,al. Acute toxicity and anti inflammatory effects of supercritical extracts of *Ilex paraguariensis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 5(8), pp. 1162-1169, August 2011
8. Siswoyo P. 2004. *Alternatif Obat Dengan Tumbuhan Alami : Tumbuhan Berkhasiat Obat*. Yogyakarta : Penerbit Absolut.
9. Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Guidline for Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity-Up-and-Down-Procedure (UDP), 425. Adopted 3rd October, 2008