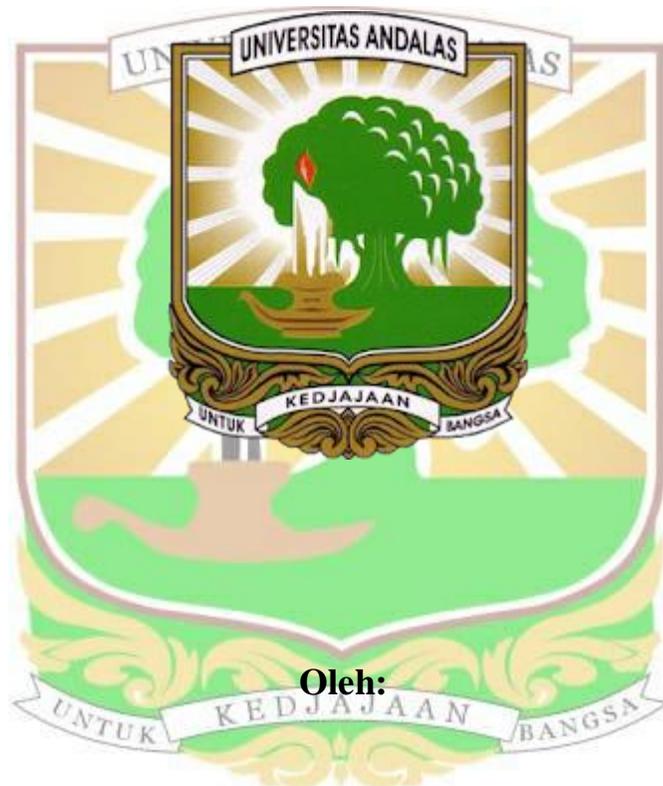


SKRIPSI SARJANA FARMASI

**UJI TOKSISITAS AKUT FRAKSI DAUN SUNGKAI (*Peronema
canescens* Jack.) SERTA PENENTUAN NILAI LD50 PADA
MENCIT PUTIH JANTAN**



Oleh:

ALFATHRI YUNEDI

NIM : 1811013018

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2022**

**UJI TOKSISITAS AKUT FRAKSI DAUN SUNGKAI (*Peronema
canescens* Jack.) SERTA PENENTUAN NILAI LD50 PADA
MENCIT PUTIH JANTAN**

Oleh :



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2022**

PERNYATAAN ORISINALITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

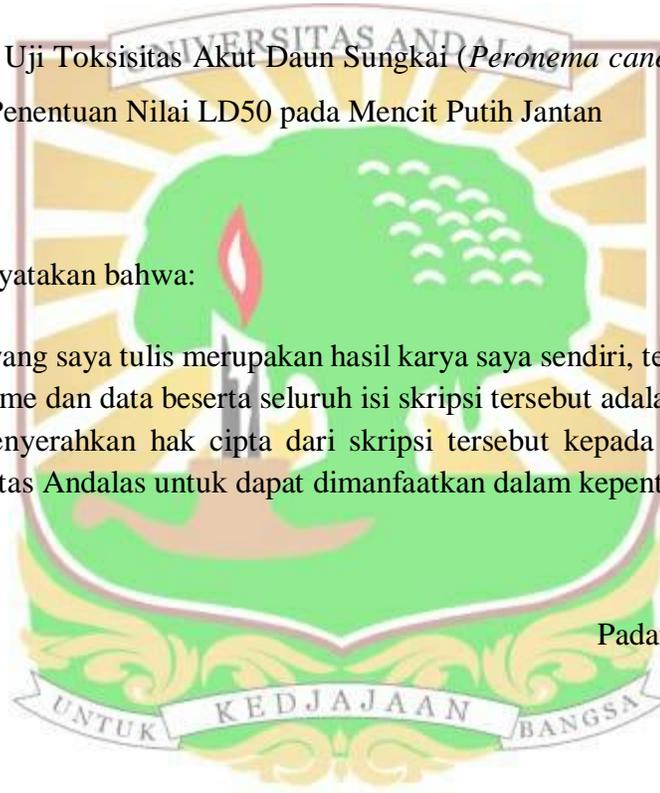
Nama : Alfathri Yunedi

No.BP : 1811013018

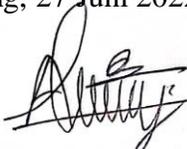
Judul Skripsi : Uji Toksisitas Akut Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack.) serta Penentuan Nilai LD50 pada Mencit Putih Jantan

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi yang saya tulis merupakan hasil karya saya sendiri, terhindar dari unsur plagiarisme dan data beserta seluruh isi skripsi tersebut adalah benar adanya.
2. Saya menyerahkan hak cipta dari skripsi tersebut kepada Fakultas Farmasi Universitas Andalas untuk dapat dimanfaatkan dalam kepentingan akademis.



Padang, 27 Juni 2022


Alfathri Yunedi

PENGESAHAN

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menempuh
Seminar Hasil
Program Sarjana (S1) Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Andalas
Padang**

Nama : Alfathri Yunedi

NIM : 1811013018

Judul Skripsi : Uji Toksisitas Akut Fraksi Daun Sungkai (*Peronema canescens jack.*) serta Penentuan Nilai LD50 pada Mencit Putih Jantan



Disetujui oleh:

Pembimbing 1

apt. Dwisari Dillasamola, M. Farm

NIP. 198205052012122004

Pembimbing 2

Dr. apt. Elidahanum Husni, M.Si

NIP. 196109181989032001

PERTAHANAN HASIL

Skripsi ini telah dipertahankan di depan Pembahas Seminar Hasil Penelitian

Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Padang

Pada tanggal : 14 Juli 2022

No	Nama	Jabatan	Tanda Tangan
1	Prof. apt. Armenia, MS, Ph. D	Ketua	
2	Prof. apt. Dachriyanus, Ph. D	Pembahas	
3	apt. Rahmad Abdillah, M.Si	Pembahas	
4	apt. Dwisari Dillasamola, M. Farm	Pembimbing 1	
5	Dr. apt. Elidahanum Husni, M.Si	Pembimbing 2	

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji dan syukur bagi kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan nikmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Uji Toksisitas Akut Fraksi Ekstrak Etanol Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack.) serta Penentuan Kisaran Nilai LD50 pada Mencit Putih Jantan” yang merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan program pendidikan sarjana farmasi di Universitas Andalas Padang.

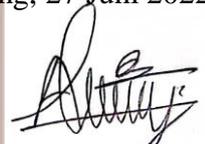
Selanjutnya penulis mengucapkan terimakasih seiring doa dan harapan kepada semua pihak yang telah membimbing dan membantu serta mendoakan sehingga terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terimakasih ini penulis sampaikan kepada :

1. Ibu Prof. Dr. Apt. Fatma Sri Wahyuni, S.Si selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Andalas.
2. Ibu Dr. apt. Meri Susanti, M.Farm selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Andalas,
3. Ibu apt. Dwisari Dillasamola, M Farm selaku pembimbing I dan Ibu Dr. apt. Elidahanum Husni, M.Si selaku pembimbing II yang telah membimbing, mengarahkan dan memberikan semangat selama penyusunan skripsi ini kepada penulis.
4. Dosen Pembahas (Ibu Prof. apt. Armenia, Ph.D), (Ibu apt. Fitri Rachmaini, S.Farm, M.Si) dan (Bapak Prof. apt. Dachriyanus, Ph.D) yang telah memberikan saran dan masukan dalam penulisan skripsi ini.
5. Ayah Edi dan Ibu Ida yang tiada hentinya mengirimkan doa dan semangat kepada penulis, serta Uni Tika yang menjadi tempat bertanya dan meminta masukan. Terima kasih telah menjadi sumber kekuatan bagi penulis.
6. Seluruh dosen, Analis Laboratorium dan karyawan-karyawati Fakultas Farmasi Universitas Andalas yang telah mendidik, memberikan ilmu yang bermanfaat serta membantu penulisan selama melaksanakan studi di Fakultas Farmasi.

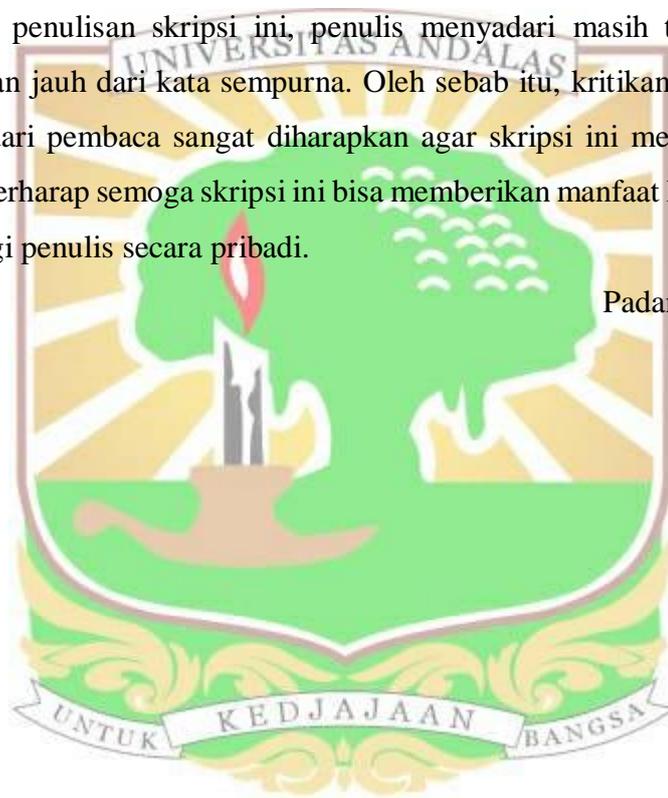
7. Kepada Tim Sungkai (Capong, Vio, Fira) yang sudah membantu dan selalu menjadi penyemangat dan selalu menghibur dikala kondisi menurun.
8. Kepada Taufik Qurauf yang sudah membantu dalam mentutorkan software SPSS kepada penulis.
9. Seluruh teman-teman Mahasiswa Universitas Andalas yang telah membantu dalam kelancaran penelitian ini.
10. Semua pihak yang terlibat langsung maupun tidak langsung yang tidak mampu penulis sebutkan satu-persatu, terimakasih atas dukungan dan doanya.

Dalam penulisan skripsi ini, penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan dan jauh dari kata sempurna. Oleh sebab itu, kritikan dan saran yang membangun dari pembaca sangat diharapkan agar skripsi ini menjadi lebih baik lagi. Penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi.

Padang, 27 Juni 2022



Alfathri Yunedhi



ABSTRAK

UJI TOKSISITAS AKUT FRAKSI DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens* Jack.) SERTA PENENTUAN NILAI LD50 PADA MENCIT PUTIH JANTAN

Oleh:

Alfathri Yunedi

NIM : 1811013018

(Program Studi Sarjana Farmasi)

Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack.) telah banyak digunakan dalam pengobatan tradisional karena memiliki potensi dalam meningkatkan sistem imun. Untuk menjamin keamanan dalam penggunaannya, perlu dilakukan uji toksisitas. Tujuan dilakukannya penelitian ini yaitu untuk mengetahui kisaran nilai LD50, status keamanan dan pengaruh fraksi daun sungkai terhadap persentase perubahan berat badan, rasio berat organ hati, organ ginjal serta perilaku mencit putih jantan. Pengujian menggunakan 75 ekor mencit yang dibagi menjadi tiga kelompok per-fraksinya. Satu fraksi terdiri dari 25 ekor mencit dibagi menjadi 5 kelompok, terdiri dari 1 kontrol dan 4 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol diberi suspensi Na-CMC 0,5% dan kelompok perlakuan diberi suspensi fraksi daun sungkai dengan dosis 1000, 2000, 4000 dan 8000 mg/kgBB. Sediaan diberikan sekali pada awal masa penelitian. Pengamatan dilakukan terhadap gejala toksisitas yang timbul, persentase perubahan berat badan dan kematian hewan uji selama 24 jam hingga 14 hari. Pemberian fraksi daun sungkai secara oral hingga dosis 8000 mg/kgBB tidak menunjukkan adanya kematian hewan uji, ini menunjukkan fraksi daun sungkai termasuk kategori tidak toksik ($LD_{50} > 5000$ mg/kgBB). Gejala toksisitas yang muncul diantaranya lemas, salivasi, tremor dan jalan dengan perut. Hasil uji statistik dianalisis menggunakan ANOVA dua arah menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara jenis fraksi dan variasi dosis terhadap persentase perubahan berat badan pada fraksi air dengan dosis 4000 mg/kgBB ($P < 0,05$). Kemudian untuk hasil uji statistik persentase berat rasio organ hati dan ginjal menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada tiap fraksi ($P < 0,05$), perbedaan yang nyata dapat terlihat pada fraksi etil asetat dengan rata-rata persentase rasio berat organ ginjal dan hati berturut-turut 0,923% dan 7,038%.

Kata Kunci: sungkai (*peronema canescens* Jack), toksisitas akut, fraksi daun sungkai, rasio organ, berat badan

ABSTRACT

ACUTE TOXICITY TEST OF SUNGKAI LEAF FRACTION (*Peronema canescens* Jack.) AND DETERMINING THE VALUE OF LD50 IN MALE WHITE MICE

By:

Alfathri Yuned

Student ID Number : 1811013018

(Bachelor of Pharmacy)

Sungkai leaf (*Peronema canescens* Jack.) has been widely used in traditional medicine because it has the potential to boost the immune system. To ensure safety in its use, it is necessary to carry out a toxicity test. The purpose of this study was to determine the range of LD50 values, safety status and the effect of the ethanol extract fraction of sungkai leaves on the percentage change in body weight, the ratio of liver and kidney weights and the behavior of white male mice. The test used 75 mice, which were divided into three groups per fraction. One fraction consisted of 25 mice divided into 5 groups, consisting of 1 control and 4 treatment groups. The control group was given 0.5% Na-CMC suspension and the treatment group was given suspension of sungkai leaf fraction at doses of 1000, 2000, 4000, and 8000 mg/kgBB. The preparation was given once at the beginning of the research period. Observations were made on the symptoms of toxicity, the percentage change in body weight and the death of the test animals for 24 hours to 14 days. Oral administration of sungkai leaf fraction up to a dose of 8000 mg/kgBW did not indicate any death of the test animals, this indicated that the sungkai leaf fraction was in the non-toxic category (LD50>5000 mg/kgBW). Symptoms of toxicity that appear include weakness, salivation, tremors and walking with the stomach. The results of statistical tests using two-way ANOVA showed a significant difference between the type of fraction and the variation in dose on the percentage change in body weight in the water fraction with a dose of 4000 mg/kgBW (P<0.05). Then, for the results of the statistical test the percentage ratio of liver and kidney weights showed a significant difference in the ethyl acetate fraction (P<0.05), a significant difference could be seen in the ethyl acetate fraction with an the average percentage ratio of kidney and liver organ weights obtained was 0.923% and 7.038%, respectively.

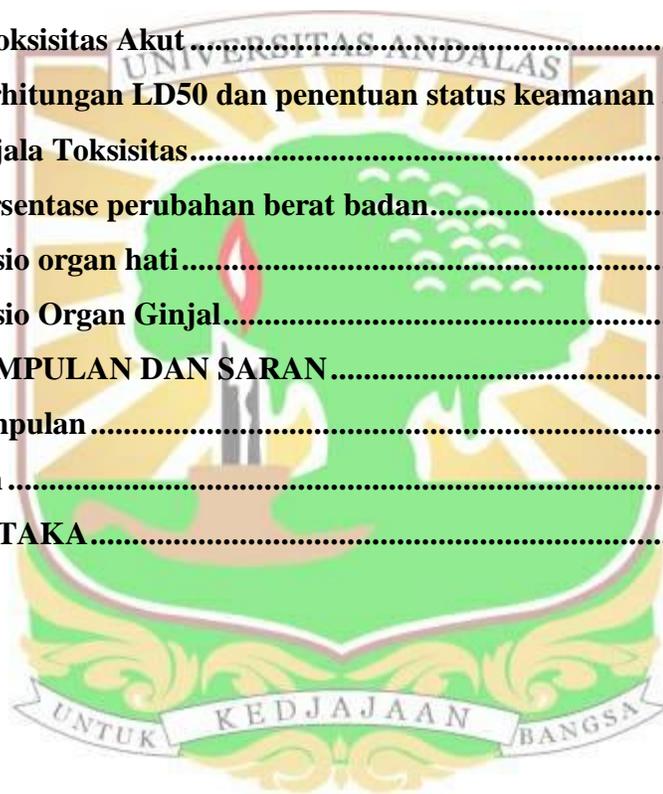
Keywords: sungkai (*Peronema canescens* Jack), acute toxicity, sungkai leaf fraction, organ ratio, body weight

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	I
PERNYATAAN ORISINALITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA	II
HALAMAN PENGESAHAN	III
PERTAHANAN HASIL	III
KATA PENGANTAR.....	V
ABSTRAK	VII
ABSTRACT	VIII
DAFTAR ISI	IX
DAFTAR GAMBAR.....	XII
DAFTAR TABEL	XIII
LAMPIRAN	XV
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesa Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan Botani Tanaman	5
2.1.1 Taksonomi.....	5
2.1.2 Nama Daerah	5
2.1.3 Deskripsi	6
2.1.4 Habitat dan Sebaran.....	6
2.1.5 Kandungan Kimia	7
2.1.6 Khasiat dan Efek Farmakologi	7
2.2 Ekstraksi	8
2.2.1 Cara Dingin.....	8

2.2.2	Cara Panas.....	9
2.2.3	Penguapan.....	10
2.2.4	Pengeringan	11
2.3	Fraksinasi.....	12
2.4	Uji Toksisitas	13
2.4.1	Jenis Uji Toksisitas	14
2.5	Lethal Dose 50 (LD50).....	17
2.5.1	Metode Penentuan LD50.....	20
2.5.2	Ketentuan Umum pada Uji Toksisitas.....	24
BAB 3	METODOLOGI PENELITIAN.....	29
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian	29
3.2	Alat dan Bahan Penelitian.....	29
3.2.1	Alat	29
3.2.2	Bahan	29
3.2.3	Hewan Percobaan	29
3.3	Prosedur Kerja	30
3.3.1	Lokasi Pengambilan Sampel	30
3.3.2	Identifikasi Tumbuhan.....	30
3.3.3	Pembuatan Simplisia	30
3.3.4	Pembuatan Ekstrak	30
3.3.5	Pembuatan Fraksi.....	30
3.3.6	Penentuan Rendemen	31
3.3.7	Standarisasi Fraksi	31
3.3.8	Perencanaan Dosis dan Pengelompokkan Hewan Uji.....	34
3.3.9	Penyiapan Hewan Uji	35
3.3.10	Pembuatan Sediaan Uji	35
3.3.11	Perlakuan terhadap Hewan Uji.....	35
3.3.12	Penimbangan Organ	36
3.4	Analisis Data	36
BAB 4	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37

4.1	Penentuan Rendemen	38
4.2	Parameter Non Spesifik.....	40
4.2.1	Pemeriksaan Susut Pengeringan.....	40
4.2.1	Penetapan Kadar Abu Total	41
4.3	Parameter Spesifik	42
4.3.1	Pemeriksaan Organoleptik.....	42
4.3.2	Skrinning Fitokimia.....	43
4.3.3	Pemeriksaan Profil KLT	45
4.4	Uji Toksisitas Akut	48
4.4.1	Perhitungan LD50 dan penentuan status keamanan	50
4.4.2	Gejala Toksisitas.....	51
4.4.3	Persentase perubahan berat badan.....	56
4.4.4	Rasio organ hati.....	60
4.4.5	Rasio Organ Ginjal.....	62
BAB 5	KESIMPULAN DAN SARAN.....	65
5.1	Kesimpulan	65
5.2	Saran	65
DAFTAR PUSTAKA.....		66



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Daun Sungkai (<i>Peronema canescens</i> Jack.).....	5
Gambar 2. Hasil KLT fraksi n-heksan daun sungkai.....	46
Gambar 3. Hasil KLT fraksi etil asetat daun sungkai.....	47
Gambar 4. Hasil KLT fraksi air daun sungkai	48
Gambar 5. Grafik pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis daun sungkai terhadap perubahan berat badan mencit putih jantan.....	57
Gambar 6. Mekanisme flavonoid dalam mengatur asupan makanan dan penyerapan nutrisi	58
Gambar 7. Grafik pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis daun sungkai terhadap rasio organ hati mencit putih jantan.....	60
Gambar 8. Grafik pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis daun sungkai terhadap rasio organ hati mencit putih jantan.....	62
Gambar 9. Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sungkai	71
Gambar 10. Lanjutan Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sungkai	72
Gambar 11. Skema Pembuatan Fraksi Daun Sungkai	73
Gambar 12. Skema Penentuan Toksisitas Akut dan LD50	74
Gambar 13. Surat keterangan lolos uji etik	87
Gambar 14. Hasil identifikasi tumbuhan	88
Gambar 15. Pengambilan daun sungkai.....	89
Gambar 16. Maserat daun sungkai	89
Gambar 17. Ekstrak etanol daun sungkai.....	89
Gambar 18. Hasil skrining fitokimia fraksi etil asetat daun sungkai.....	90
Gambar 19. Hasil skrining fitokimia fraksi n-heksan daun sungkai	90
Gambar 20. Hasil skrining fitokimia fraksi air daun sungkai	90
Gambar 21. Pengeringan organ hati dan ginjal	91
Gambar 22. Sediaan suspensi fraksi daun sungkai	91

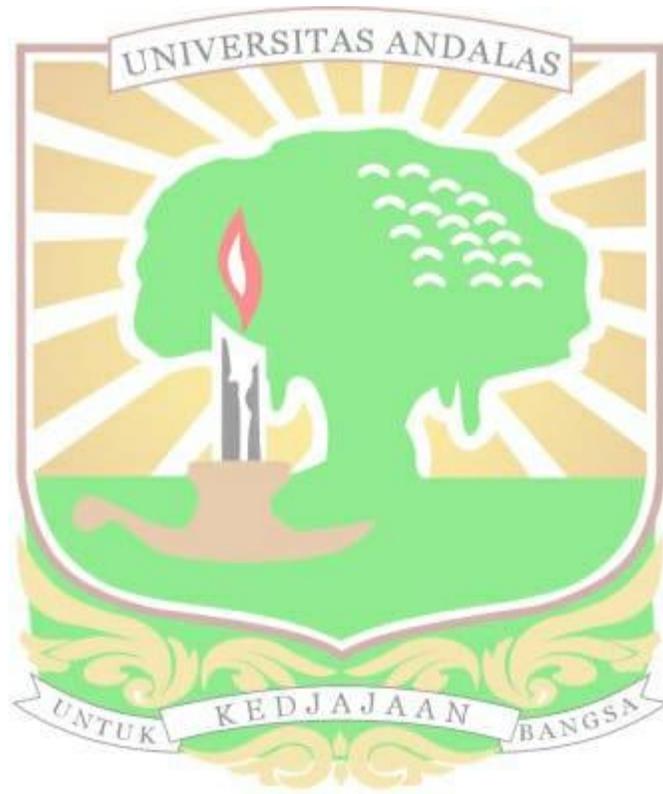
DAFTAR TABEL

Tabel 1. Klasifikasi nilai LD50	18
Tabel 2. Thompson Weil.....	22
Tabel 3. Kriteria Hewan Uji	26
Tabel 4. Hasil Penetapan Susut Pengeringan Ekstrak Etanol Daun Sungkai.....	41
Tabel 5. Hasil Penetapan Kadar Abu Simplisia Kering Daun Sungkai.....	41
Tabel 6. Hasil Penetapan Kadar Abu Ekstrak Etanol Daun Sungkai	42
Tabel 7. Pemeriksaan Organoleptis Fraksi N-heksan.....	42
Tabel 8. Pemeriksaan Organoleptis Fraksi Etil Asetat	43
Tabel 9. Pemeriksaan Organoleptis Fraksi Air.....	43
Tabel 10. Hasil Uji Fitokimia Fraksi N-heksan Daun Sungkai.....	44
Tabel 11. Hasil Uji Fitokimia Fraksi Etil Asetat Daun Sungkai	44
Tabel 12. Hasil Uji Fitokimia Fraksi Air Daun Sungkai	45
Tabel 13. Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas Fraksi n-heksan.....	51
Tabel 14. Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas Fraksi Etil Asetat	52
Tabel 15. Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas Fraksi Fraksi Air	54
Tabel 16. Kriteria penggolongan sediaan uji menurut OECD 420.....	55
Tabel 17. Pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis terhadap perubahan berat badan mencit putih jantan.....	56
Tabel 18. Pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis terhadap rasio organ Hati mencit putih jantan.....	60
Tabel 19. Pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis terhadap rasio organ Hati mencit putih jantan.....	62
Tabel 20. Data persentase perubahan BB fraksi n-heksan.....	75
Tabel 21. Data persentase perubahan BB fraksi etil asetat	76
Tabel 22. Data persentase perubahan BB fraksi air	77

Tabel 23. Persentase berat rasio organ hati fraksi n-heksan	78
Tabel 24. Persentase berat rasio organ hati fraksi etil asetat.....	78
Tabel 25. Persentase berat rasio organ hati fraksi air	78
Tabel 26. Persentase berat rasio organ ginjal fraksi n-heksan	79
Tabel 27. Persentase berat rasio organ ginjal fraksi etil asetat.....	79
Tabel 28. Persentase berat rasio organ ginjal fraksi air	79
Tabel 29. Hasil uji normlitas data berdasarkan jenis fraksi dan variasi dosis dari.....	80
Tabel 30. Hasil uji homogenitas data berdasarkan jenis fraksi dan variasi dosis dari	80
Tabel 31. Hasil Uji ANOVA dua arah pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis	81
Tabel 32. Hasil uji Duncan pengaruh jenis fraksi terhadap persentase perubahan	81
Tabel 33. Hasil uji Duncan pengaruh variasi dosis terhadap persentase perubahan ..	82
Tabel 34. Hasil uji normlitas data berdasarkan jenis fraksi dan variasi dosis dari.....	82
Tabel 35. Hasil uji homogenitas data berdasarkan jenis fraksi dan variasi dosis daun	83
Tabel 36. Hasil Uji ANOVA dua arah pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis	83
Tabel 37. Hasil uji Duncan pengaruh jenis fraksi terhadap rasio organ hati mencit ..	83
Tabel 38. Hasil uji Duncan pengaruh variasi dosis terhadap rasio organ hati mencit	84
Tabel 39. Hasil uji normlitas data berdasarkan jenis fraksi dan variasi dosis dari.....	84
Tabel 40. Hasil uji homogenitas data berdasarkan jenis fraksi dan variasi dosis daun	85
Tabel 41. Hasil Uji Anova dua arah pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis terhadap	85
Tabel 42. Hasil uji Duncan pengaruh jenis fraksi terhadap rasio organ ginjal mencit	85
Tabel 43. Hasil uji Duncan pengaruh variasi dosis terhadap rasio organ ginjal	86

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja.....	71
Lampiran 2. Data Penelitian.....	75
Lampiran 3. Hasil Perhitungan Statistik	80
Lampiran 4. Data Penunjang	87



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keberadaan obat herbal dari tumbuh-tumbuhan telah dikenal sejak ribuan tahun, ini terbukti dari tulisan yang tertulis di daun Lontar, di dinding monumen dan di dalam kitab suci tua. Pengetahuan tentang obat herbal sebagai resep obat telah diturunkan sebagai warisan dalam komunitas besar di dunia (1). Banyak jenis penyakit yang berhubungan dengan kesehatan dapat disembuhkan dengan menggunakan formulasi obat herbal. Oleh karena itu, pengetahuan tentang resep herbal sebagai obat harus dirawat dan dilestarikan sebagai warisan bangsa (1).

Lebih dari 248.000 spesies tumbuhan tingkat tinggi telah diidentifikasi dan 12.000 tanaman diketahui memiliki khasiat obat. Data WHO menyebutkan sistem pengobatan secara tradisional masih melekat pada masyarakat yakni sekitar 80% dari penduduk dunia. Sejarah panjang menunjukkan bahwa terdapat banyak praktik pengobatan secara tradisional berdasarkan pengalaman dan kemudian diteruskan dari generasi ke generasi, telah menunjukkan keamanan dan kemanjuran obat tradisional. Namun, perlu adanya penelitian ilmiah untuk membuktikan kemanjuran dan keamanan dari obat tradisional tersebut (2). WHO juga merekomendasikan penggunaan obat tradisional termasuk obat herbal dalam strategi 2014–2023, dengan tujuan menjaga kesehatan penduduk melalui penyediaan akses ke pengobatan alternatif yang efektif dan terjangkau (3).

Indonesia adalah negara dengan sumber daya alam yang sangat melimpah khususnya sumber daya alam hayati yang memiliki jumlah tanaman obat sekitar 40.000 jenis, dimana sekitar 2,5% yang telah dieksplorasi dan dimanfaatkan sebagai obat tradisional (4). Tidak kurang dari 30.000 spesies tumbuhan ada di negara kita, 9.600 spesies di antaranya diketahui memiliki khasiat, namun belum semuanya dimanfaatkan secara optimal sebagai obat. Beberapa di antaranya telah dilengkapi dengan data keamanan dan kemanfaatannya. Sementara itu, banyak juga penelitian untuk standarisasi bahan, baik uji pra-klinik untuk meningkatkan status jamu

menjadi obat herbal terstandar, maupun uji klinik sebagai bukti ilmiah penggunaan bahan alam sebagai fitofarmaka (5).

Pada saat ini, perhatian dunia terhadap penggunaan bahan alam dalam pengobatan meningkat. Berbagai negara telah mengintegrasikan bahan alam dalam menghadapi Covid-19. Obat tradisional dari bahan alam dipercaya mampu menahan laju kasus Covid 19 melalui potensi peningkatan sistem kekebalan tubuh karena bersifat pencegahan (preventif) dan promotif melalui kandungan metabolit sekundernya (5).

Sungkai sebagai tumbuhan obat tradisional merupakan tumbuhan yang banyak dipakai oleh suku yang ada di Sumatera dan Kalimantan, dengan bagian daun muda digunakan sebagai antiplasmodium, obat cacing, demam, obat pilek dan dapat dijadikan sebagai ramuan bagi wanita selepas bersalin serta peningkat daya tahan tubuh (1). Sungkai (*Peronema canescens*) sering disebut sebagai jati sabrang, ki sabrang, kurus sungkai, atau sekai. Daun sungkai dapat dijumpai di hutan, kebun, maupun halaman, biasanya ditanam sebagai pembatas rumah atau berfungsi sebagai pagar hidup pada bagian belakang rumah (6)(7). Daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) termasuk kedalam famili Verbenaceae. Daun sungkai dipercaya memiliki aktivitas antioksidan alami dan juga dapat meningkatkan sistem imun agar pengobatan secara tradisional dapat digunakan dalam sistem pelayanan kesehatan dan sesuai kaidah pelayanan kesehatan formal (4).

Beberapa tanaman dilaporkan tidak hanya mengandung metabolit sekunder yang bersifat toksik, tetapi juga tercemar oleh polutan udara terutama logam berat yang dapat mengakibatkan gangguan kesehatan yang serius. Dengan demikian, ada kebutuhan untuk menilai keamanan ekstrak daun sungkai untuk konsumsi manusia sebelum mempertimbangkan potensi terapeutiknya. Salah satu cara efektif yang dapat dilakukan adalah melalui melakukan tes toksisitas oral akut *in vivo* (8). Oleh karena itu, perlu dilakukan serangkaian pengujian dalam menjamin keamanan bahan alam tersebut. Salah satu uji keamanan obat tradisional yang biasanya dilakukan adalah uji toksisitas (9).

Uji toksisitas adalah suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis-respon yang khas dari sediaan uji. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberi informasi mengenai derajat

bahaya sediaan uji tersebut bila terjadi pemaparan pada manusia, sehingga dapat ditentukan dosis penggunaannya demi keamanan manusia (10). Salah satu jenis uji toksisitas yang sering digunakan adalah Uji Toksisitas Akut Oral. Uji toksisitas akut oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji yang diberikan secara oral dalam dosis tunggal, atau dosis berulang yang diberikan dalam waktu 24 jam (10). Beberapa tes toksisitas akut (seperti tes LD50 "klasik") dirancang untuk menentukan dosis mematikan rata-rata zat uji (11).

LD50 (*median lethal oral dose*) adalah dosis tunggal zat yang diturunkan secara statistik yang dapat menyebabkan kematian pada 50 persen hewan bila diberikan melalui rute oral. Nilai LD50 dinyatakan dalam berat bahan uji per satuan berat hewan uji (mg/kg) (12). Parameter yang diamati dalam uji ini adalah perubahan perilaku mencit seperti gejala toksisitas (tremor, diare, salivasi, lemas, jalan mundur, jalan menggunakan perut), perubahan berat badan dan jumlah hewan yang mati pada masing-masing kelompok uji (13).

Mengingat potensi daun sungkai yang cukup besar dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan menilai LD50 pada uji toksisitas menjadi salah satu syarat uji praklinis dalam pengembangan obat tradisional, maka peneliti terdorong untuk melakukan penelitian terkait LD50 dari beberapa fraksi bertingkat dari ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) terhadap mencit putih jantan. Hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Melisa telah didapatkan nilai LD50 > 5000 mg/kgBB yang berarti masuk ke dalam kategori tidak toksik (14). Hasil ini diharapkan dapat memberi informasi terkait tingkat keamanan dari fraksi ekstrak daun sungkai dan dapat dijadikan dasar pada pengujian keamanan serta dilanjutkan dengan isolasi senyawa murni dari daun sungkai berikutnya.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah fraksi ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) memberikan efek toksik terhadap mencit putih jantan?
2. Bagaimana pengaruh fraksi ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) terhadap rasio berat organ hati dan ginjal mencit putih jantan?

3. Bagaimana pengaruh pemberian masing-masing fraksi ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) terhadap persentase perubahan berat badan dan perilaku mencit putih jantan?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui efek toksik masing-masing fraksi ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) terhadap mencit putih jantan.
2. Mengetahui adanya pengaruh masing-masing fraksi ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) terhadap rasio berat organ hati dan ginjal mencit putih jantan
3. Mengetahui pengaruh pemberian masing-masing fraksi ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) terhadap persentase perubahan berat badan dan perilaku mencit

1.4 Hipotesa Penelitian

1. Fraksi ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) tidak memberikan efek toksik yang berbahaya
2. Fraksi ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) tidak mempengaruhi rasio berat organ hati dan ginjal mencit putih jantan
3. Pemberian fraksi ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack.) tidak mempengaruhi persentase perubahan berat badan dan perilaku mencit putih jantan

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani Tanaman

2.1.1 Taksonomi



Gambar 1. Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack.)

Berdasarkan ilmu taksonomi, klasifikasi daun sungkai adalah sebagai berikut:

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Ordo : Lamiales
- Famili : Verbenaceae
- Genus : *Peronema*
- Spesies : *Peronema canescens* Jack. (15).

2.1.2 Nama Daerah

Nama daerah tumbuhan sungkai berbeda di beberapa daerah. Di Sumatera sungkai disebut sekai, sungkai, sungkih. Di Kalimantan di kenal dengan longkai, lurus, sungkai dan di daerah Jawa dikena dengan jati sabrang, sungkai (16).

2.1.3 Deskripsi

Sungkai (*Peronema canescens*) termasuk famili Verbenaceae, sungkai merupakan salah satu tumbuhan asli Kalimantan. Tanaman ini juga tersebar di Sumatra Barat, Bengkulu, Jambi, Sumatra Selatan dan Jawa Barat. Sungkai banyak tumbuh di hutan sekunder dan dapat tumbuh pada berbagai jenis tanah. Tapi biasanya, sungkai tumbuh pada tanah yang cukup mengandung air, seperti di tepi sungai atau tergenang air tawar. Sungkai cocok tumbuh di daerah tropis bercurah hujan A hingga C, baik di tanah kering maupun sedikit basah pada ketinggian 0 mdpl hingga 600 m dpl. Tanaman itu merupakan jenis kayu-kayuan yang bisa mencapai tinggi 20 – 30 meter, dengan diameter batang mencapai 60 cm atau lebih. Tinggi batang bebas cabang bisa mencapai 15 meter (17).

Bentuk batang lurus dengan lekuk kecil. Kulitnya berwarna abu-abu beralur dangkal, mengelupas kecil-kecil dan tipis. Penampang kulit luar berwarna cokelat, kuning, atau merah muda. Kayunya berteras dengan warna sawo muda dan menyerupai kayu jati dan mempunyai alur, rantingnya penuh dengan bulu-bulu halus (18). bunga dalam kedudukan malai, cabangnya lebar-lebar dan letaknya berpasangan, panjang 20-40 cm. Bunga letaknya hampir duduk, kelopak bunga agak tertutup rapat dan berbulu. Ukurannya ½ mm-2 mm, warnanya hijau pada pangkal (15).

Kayu teras berwarna krem atau kuning muda, warna kayu gubal sukar dibedakan dengan kayu teras. Tekstur kayu kasar dan tidak merata. Arah serat lurus, kadang-kadang agak bergelombang. Permukaan kayu agak mengkilap. Sungkai memiliki berat jenis 0,63 (0,52-0,73). Memiliki sifat kimia, kadar selulosa 48,6 %, lignin nol, Pentosan 16,5 %, Abu 1,6 % dan silika 0,4 % (16).

2.1.4 Habitat dan Sebaran

Sungkai umumnya tumbuh baik pada ketinggian 0 – 600 meter dengan tipe iklim A - C menurut tipe curah hujan Schmidt dan Ferguson. Penanaman pohon sungkai memerlukan tanah yang baik sedangkan ditanah margel tidak dianjurkan karena tanaman akan menjadir layu dan kering (15).

Pohon sungkai tersebar di daerah Sumatera Selatan, Jawa Barat, Kalimantan Barat, Kalimantan Selatan dan Kalimantan Tengah. Tempat tumbuh utama sungkai

di hutan sekunder yang berair dan kadang-kadang terdapat juga di hutan sekunder yang kering, akan tetapi tidak dijumpai di hutan primer serta daerah yang periodik tergenang air (15).

2.1.5 Kandungan Kimia

Hasil skrining fitokimia pada daun sungkai masing-masing berbeda tergantung dari jenis pelarut yang digunakan. Ekstrak etil asetat dari daun sungkai mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tannin dan fenolik. Sedangkan ekstrak dari metanol daun sungkai teridentifikasi adanya senyawa alkaloid, flavanoid, terpenoid-steroid dan tannin (17).

Ekstrak isolasi daun sungkai oleh pelarut n-heksana, menghasilkan isolat Vitamin B1. yang termasuk dalam senyawa terpenoid, pada panjang gelombang maksimal 207 nm menggunakan Spektrofotometer Ultra Violet (UV). Selain itu analisis dengan menggunakan Spektrofotometer Infra Merah, didapatkan fungsional hidroksida, fungsional alifatik, fungsi karbonil, fungsi keton dan ester fungsional (18).

Penelitian oleh Kitagawa menyebutkan bahwa pada daun Sungkai memiliki Peronemin sebagai senyawa aktif dan lainnya adalah Sitosterol, isopropanol, fitol, n- heksane n - amirin. Ada banyak jenis peronemin, seperti Peronemin A2, A3, B1, B3 C1 dan D1. Hasil penelitian oleh Kitagawa yang telah menguji secara in vitro isolat senyawa murni daun sungkai menunjukkan aktivitas penghambatan anti-malaria dengan nilai ($IC_{50} = 13,1\mu m$) efektif melawan proliferasi patogen malaria *plasmodium falciparum* (19).

2.1.6 Khasiat dan Efek Farmakologi

Penggunaan tradisional daun muda sungkai digunakan sebagai obat pilek, demam, obat cacingan (*ringworms*), mandi bagi wanita selepas bersalin dan sebagai obat kumur pencegah sakit gigi (20). Dalam pengobatan suku Lembak, seduhan daun *Peronema Canescens* digunakan untuk penurun panas, malaria dan daya tahan tubuh (6).

Masyarakat Sumatera Selatan dan Lampung memanfaatkan daun sungkai sebagai antiplasmodium serta obat demam. Suku Serawai menggunakan daun

sungkai untuk menghilangkan sakit memar dengan cara menumbuk daun tersebut kemudian ditampal di bagian yang sakit. Berbeda hal dengan suku Lembak, daun sungkai biasa disajikan dalam bentuk air seduhan yang dipercaya untuk penurunan panas, malaria dan menjaga kesehatan (6).

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penyarian atau penarikan senyawa kimia berdasarkan kelarutannya. Proses pemisahan ini dilakukan dengan melarutkan simplisia nabati atau hewani dalam pelarut yang sesuai sehingga satu atau lebih komponen dalam sampel dapat tertarik. Seluruh atau hampir seluruh pelarut ini kemudian diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa sampai memenuhi baku yang telah ditetapkan. Hasil dari proses ekstraksi disebut ekstrak yaitu berupa sediaan yang pekat (21).

Ekstrak yang diperoleh dapat berbentuk cair, kental, ataupun kering. Ekstrak cair adalah ekstrak yang masih mengandung sebagian besar pelarutnya. Ekstrak kental adalah ekstrak yang sebagian besar pelarutnya sudah diuapkan. Sedangkan ekstrak kering adalah ekstrak yang seluruh pelarutnya diuapkan sehingga tidak lagi mengandung pelarut (22).

Pemilihan pelarut sangat penting untuk ekstraksi pelarut. Selektivitas, kelarutan, biaya dan keamanan harus dipertimbangkan dalam pemilihan pelarut. Berdasarkan hukum kesamaan dan *intmiscibility (like dissolves like)*, pelarut dengan nilai polaritas dekat dengan polaritas zat terlarut cenderung berkinerja lebih baik dan sebaliknya. Alkohol (EtOH dan MeOH) adalah pelarut universal dalam pelarut ekstraksi untuk penyelidikan fitokimia (23).

Metode ekstraksi menggunakan pelarut dapat dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya:

2.2.1 Cara Dingin

a) Maserasi

Maserasi adalah teknik yang paling umum diterapkan dalam pembuatan anggur dan sekarang diadopsi secara umum dalam penggunaan untuk penelitian produk alami/tanaman obat. Prosesnya melibatkan perendaman bahan tanaman biasanya dalam bentuk bubuk atau kasar dalam wadah tertutup dengan pelarut

tertentu. Pengaturan dibiarkan pada suhu kamar ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) selama minimal 72 jam dengan pengocokan yang konstan. Proses ini dikondisikan untuk melunakkan dan memecah dinding sel tanaman untuk membebaskan metabolit bioaktif terlarut. 3 hari, seluruh campuran dipres dan diayak dengan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman no 1. Dalam maserasi, pemilihan pelarut sangat penting untuk menentukan jenis fitokimia yang diekstraksi dari sampel (24).

b) Perkolasi

Perkolasi merupakan proses penyarian simplisia menggunakan pelarut yang selalu baru dan biasanya dilakukan pada temperature ruangan (kamar). Proses pemisahan ini menggunakan alat yang dinamakan perkolator dimana simplisia direndam dalam cairan penyari kemudian zat-zat aktif akan terlarut dan menetes secara beraturan. Tahapan pada perkolasi terdiri dari pengembangan bahan, perendaman antaram dan yang terakhir penampungan tetesan perkolat hingga diperoleh ekstrak. Sebelumnya serbuk simplisia yang akan diperkolasi tidak langsung dimasukkan ke dalam percolator, melainkan dimaserasi terlebih dahulu sekurang-kurangnya selama 3 jam (21).

2.2.2 Cara Panas

a) Refluks

Refluks merupakan proses penyarian simplisia menggunakan pelarut pada temperatur titik didihnya dalam kurun waktu tertentu. Pelarut yang dipakai tidak dalam jumlah yang besar dan relatif konstan karena pelarut akan terkondensasi dari labu menuju pendingin kemudian kembali lagi ke labu. Umumnya proses diatas diulangi 3 sampai 5 kali pada residu pertama (21).

b) Sokletasi

Sokletasi merupakan proses penyarian menggunakan cairan penyari yang selalu baru. Proses ini menggunakan alat soklet, dimana prinsipnya terjadi ekstraksi kontinu yaitu pelarut akan terkondensasi dari labu menuju pendingin, kemudian jatuh membasahi sampel (21).

c) Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada suhu 40 - 50°C (21).

d) Infundasi

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperature penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15 - 20 menit) (21). Infus dan dekoktasi menggunakan prinsip yang sama seperti maserasi; keduanya direndam dalam air dingin atau direbus. Namun, periode maserasi untuk infus lebih pendek dan sampel direbus dalam volume air tertentu (misalnya 1:4 atau 1:16) untuk waktu tertentu untuk rebusan (24).

e) Dekoktasi

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (~30°C) dan suhu sampai titik didih udara (21). produk mentah yang baru dipanen direbus dalam volume air tertentu untuk jangka waktu tertentu dan didinginkan kemudian disaring atau disaring. Prosedur ini berlaku untuk ekstraksi metabolit yang larut dalam air dan stabil terhadap panas. Rasio awal produk mentah dengan air adalah tetap, seperti 1:4 atau 1:16. Dekoktasi umumnya cocok untuk mengekstraksi senyawa tahan panas, bagian tanaman keras seperti akar dan kulit kayu dan hasilnya memberikan lebih banyak fitokimia yang larut dalam minyak dibandingkan dengan maserasi dan infus (24).

2.2.3 Penguapan

Penguapan atau biasa disebut pemekatan merupakan proses ekstraksi yang bertujuan untuk menguapkan cairan penyari yang masih banyak terkandung di dalam ekstrak sehingga diperoleh ekstrak yang lebih pekat. Ekstrak yang didapatkan dari proses ini memiliki konsentrasi yang lebih besar dan lebih mudah untuk disimpan. Ekstrak cair atau kental bisa didapatkan dengan melakukan penguapan secara parsial. Dalam proses ini, suhu yang terlalu tinggi tidak dianjurkan untuk menghindari terurainya senyawa kimia yang terkandung dalam

ekstrak. Penguapan biasa dilakukan sebelum ekstrak diproses lebih lanjut, seperti pemisahan atau fraksinasi (22).

Penggunaan oven dapat dilengkapi dengan alat vakum yang akan membuat kondisi oven hampa udara sehingga proses penguapan akan lebih cepat. Dewasa ini, penguapan sering dilakukan menggunakan alat penguap putar (rotary evaporator). Prinsip alat ini yaitu terjadinya penguapan pada suhu yang tidak terlalu tinggi sekitar 40-50°C dan adanya alat vakum udara yang membuat titik didih pelarut menjadi lebih rendah. Karena prosesnya berlangsung cepat, hal ini dapat menghindari terjadinya penguraian senyawa-senyawa di dalam ekstrak yang bersifat termolabil (22).

Penguapan dapat juga dilakukan menggunakan alat penangas air. Prosesnya tergolong sederhana dan mudah serta cocok untuk ekstrak yang pelarutnya memiliki titik didih yang rendah. Namun kelemahan proses ini adalah senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak dapat terurai oleh pemanasan yang cukup lama. Oleh karena itu, penguapan dengan oven lebih sering dilakukan, khususnya pada ekstrak yang pelarutnya sedikit. Kelebihan pada oven yaitu dapat mengatur suhu sesuai dengan titik didih pelarut (22).

2.2.4 Pengerinan

Ekstrak kental yang didapat dari proses penguapan dapat dilanjutkan dengan proses pengerinan untuk mendapatkan ekstrak kering. Hal ini bertujuan untuk menjamin stabilitas senyawa aktif yang terkandung. Proses ini dapat menggunakan alat yang konvensional seperti pengering vakum ataupun yang lebih modern seperti pengering beku (*freeze dryer*) pada suhu rendah atau beku dan pengering semprot (*spray dryer*) pada suhu tinggi (22).

a) *Freeze drying*/Liofilisasi

Freeze drying adalah metode yang didasarkan pada prinsip sublimasi, di mana air berpindah langsung dari keadaan padat (es) ke keadaan uap tanpa harus melewati keadaan cair. Sublimasi air dapat berlangsung pada tekanan dan suhu di bawah titik tripel yaitu 4,579 mmHg dan 0,0099 °C. Bahan yang akan dikeringkan pertama-tama dibekukan dan kemudian dipanaskan di bawah vakum tinggi (dengan konduksi atau radiasi atau bersamaan keduanya) sehingga cairan beku menyublim

hanya menyisakan komponen padat dan kering dari cairan aslinya. Gradien konsentrasi uap air antara bagian depan pengeringan dan kondensor merupakan kekuatan pendorong untuk menghilangkan air selama liofilisasi (25). Setelah dibekukan selama kurang lebih 12 jam atau semalaman, sampel dengan cepat diliofilisasi untuk menghindari cairan beku dalam sampel meleleh. Mulut tabung reaksi atau wadah apa pun yang menampung sampel dibungkus dengan parafilm yang ditusuk jarum untuk mencegah hilangnya sampel selama proses (24).

b) *Spray drying*

Spray drying banyak digunakan dalam industri untuk konversi suspensi atau larutan menjadi produk bubuk kering. Dalam pengeringan semprot, suspensi atau umpan larutan diatomisasi dan tetesan yang terbentuk bersentuhan dengan gas panas. Ketika tetesan dan gas yang dipanaskan bersentuhan, pelarut dalam tetesan menguap, meninggalkan produk bubuk kering. Pengeringan semprot saat ini merupakan salah satu teknologi paling menarik untuk industri farmasi. Ini adalah proses yang ideal di mana produk akhir memenuhi standar kualitas yang tepat mengenai distribusi ukuran partikel, kadar air sisa/pelarut, kerapatan curah dan morfologi (26).

2.3 Fraksinasi

Fraksinasi pada prinsipnya adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang saling tidak bercampur. Pelarut yang umumnya dipakai untuk fraksinasi adalah n-heksan, etil asetat dan metanol. Untuk menarik lemak dan senyawa non polar digunakan n-heksan, etil asetat untuk menarik senyawa semi polar sedangkan metanol untuk menarik senyawa-senyawa polar. Dari proses fraksinasi ini dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan. Sebagaimana diketahui bahwa senyawa-senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut yang non polar sedangkan senyawa-senyawa yang polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar juga. Tiap-tiap fraksi diuapkan sampai kental dengan penguapan putar pada suhu kurang lebih 50°C (27).

Proses ini dapat dilakukan dengan berbagai cara, yang masing-masing dikelompokkan sesuai dengan satu atau lebih fitur tertentu. Dengan demikian,

kelarutan, ukuran, bentuk, muatan listrik dan beberapa fitur lainnya dapat mempengaruhi pengelompokan senyawanya. Jumlah dan senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi berbeda-beda tergantung pada jenis tumbuhan. Dalam melakukan fraksinasi digunakan dua metode yaitu dengan menggunakan corong pisah dan kromatografi kolom. Fraksinasi juga dapat dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair atau dengan kromatografi cair vakum (KCV), Size Exclusion Chromatography (SEC) dan Solid-Phase Extraction (SPE) (27).

2.4 Uji Toksisitas

Uji toksisitas adalah suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis-respon yang khas dari sediaan uji. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberi informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji tersebut bila terjadi pemaparan pada manusia, sehingga dapat ditentukan dosis penggunaannya demi keamanan manusia (10).

Tujuan pengujian toksisitas adalah untuk memberikan informasi tentang efek biologis zat, sehingga tindakan pencegahan dapat diambil untuk melindungi manusia, hewan dan lingkungan dari efek buruk produk yang digunakan dalam pengobatan, industri, pertanian dan rumah tangga. Beberapa tes yang melibatkan penggunaan hewan hidup dimaksudkan untuk memprediksi kemungkinan efek bahan kimia pada spesies selain manusia (toksikologi lingkungan), tetapi sebagian besar dimaksudkan untuk memberikan informasi yang dianggap perlu untuk melindungi kesehatan manusia (28).

Efek toksik sangat beragam dalam mempengaruhi sifat, organ sasaran, maupun mekanisme kerjanya. Toksikan umumnya hanya mempengaruhi satu atau beberapa organ saja, tergantung kepekaan suatu organ dan konsentrasi bahan kimia serta metabolit yang terdapat pada organ tersebut. Hal-hal berikut ini dapat mempengaruhi efek toksik di dalam tubuh, seperti: absorpsi, distribusi, ekskresi senyawa, peningkatan atau penurunan biotransformasi dan tingkat kepekaan reseptor pada organ target. Bentuk dan manifestasi toksiknya suatu zat pada suatu spesies dipengaruhi oleh berbagai faktor. Faktor yang berperan adalah dosis dan lamanya paparan serta faktor lain seperti spesies dan strain hewan, jenis kelamin, umur, serta status gizi dan hormonal (29).

2.4.1 Jenis Uji Toksisitas

Uji toksisitas dibagi menjadi dua kategori besar yaitu uji toksisitas umum (uji toksisitas akut, uji toksisitas subakut, uji toksisitas subkronis dan uji toksisitas kronis) dan uji toksisitas khusus (uji mutagen, uji teratogen dan uji karsinogen).

2.4.1.1 Uji Toksisitas Umum

a) Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji yang diberikan secara oral dalam dosis tunggal, atau dosis berulang yang diberikan dalam waktu 24 jam (30). Pengujian toksisitas akut dapat digunakan dalam penilaian risiko bahan kimia untuk manusia dan organisme lingkungan non-target. Studi toksisitas akut lebih baik digambarkan sebagai LD50, yang didefinisikan sebagai dosis yang membunuh 50% hewan (31).

Prinsip uji toksisitas akut oral yaitu, sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok, kemudian dilakukan pengamatan terhadap adanya efek toksik dan kematian. Hewan yang mati selama percobaan dan yang hidup sampai akhir percobaan diotopsi untuk dievaluasi adanya gejala-gejala toksisitas (30).

b) Uji Toksisitas Sub Akut

Uji ini dilakukan untuk mengetahui organ yang dipengaruhi oleh tingkatan dosis yang berbeda. Studi ini mengakses sifat toksik dari tingkatan dosis dalam situasi yang lebih realistis daripada studi toksisitas akut. Tiga tingkat dosis biasanya digunakan. Dosis yang cukup tinggi untuk menimbulkan tanda-tanda toksisitas yang pasti tetapi tidak membunuh banyak hewan, dosis menengah dan dosis rendah yang diharapkan tidak menimbulkan efek toksik. Dosis umumnya dipilih berdasarkan informasi yang diperoleh dalam studi toksisitas akut menggunakan LD50 dan kemiringan kurva respons dosis. Durasi studi toksisitas sub-akut tergantung pada durasi yang diinginkan dari zat uji (31).

Durasi studi toksisitas dosis berulang biasanya terkait dengan durasi, indikasi terapeutik dan periode dosis yang diusulkan dari uji klinis Fase I. Untuk beberapa indikasi klinis, studi 2 minggu mungkin cukup untuk mendukung uji

klinis Fase I. Namun, untuk sebagian besar produk, studi 4 minggu diperlukan untuk memberikan informasi keamanan yang cukup untuk uji coba di mana lebih dari dosis tunggal direncanakan. Studi toksisitas dosis berulang selama 4 minggu biasanya dilakukan sebagai studi "lanjutan" setelah studi akut (untuk dosis tunggal) dan 1 hingga 2 minggu (penemuan rentang dosis) telah dilakukan. Dengan demikian, penelitian selama 4 minggu dilakukan untuk memperkuat data toksisitas untuk produk potensial farmasi (32).

c) Uji Toksisitas Kronis

Uji toksisitas kronis oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji secara berulang selama sebagian besar umur hewan uji (30). Studi toksisitas kronis dilakukan dengan minimal satu hewan pengerat dan satu spesies bukan hewan pengerat. Senyawa uji diberikan selama lebih dari 90 hari dan hewan-hewan tersebut diamati secara berkala. Sebuah studi toksikologi kronis menyediakan kesimpulan tentang efek jangka panjang dari zat uji di hewan dan dapat diestrapolasikan untuk keselamatan manusia dari zat uji. Laporan tentang toksisitas oral kronis sangat penting untuk entitas obat baru. Sebaiknya ada sedikit variasi individu antara hewan dan variasi berat yang diijinkan kisarannya adalah $\pm 20\%$ (33).

Sebelum pembentukan *International Conference for Harmonization* (ICH), ekspektasi regulasi untuk pengujian toksisitas kronis berbeda antara tiga wilayah (AS, Jepang dan Uni Eropa). Amerika Serikat dan Jepang membutuhkan 12 bulan dan badan-badan Eropa Studi 6 bulan untuk mencakup periode sementara antara studi karsinogenisitas 3 bulan dan 2 tahun. Ini mengakibatkan banyak perusahaan farmasi melakukan dua studi dosis berulang kronis pada hewan pengerat dan bukan hewan pengerat, salah satu dari durasi 6 bulan di setiap spesies untuk mendukung uji klinis dan salah satu dari durasi 12 bulan untuk mendukung pemasaran di Amerika Serikat dan Jepang (32).

d) Uji Toksisitas Sub Kronis

Uji toksisitas subkronis oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan secara oral pada hewan uji selama sebagian umur hewan, tetapi tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan (30).

Prinsip dari uji toksisitas subkronis oral adalah sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok selama 28 atau 90 hari dan ditambahkan kelompok satelit untuk melihat adanya efek tertunda atau efek yang bersifat reversibel. Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama periode pemberian sediaan uji, bila belum melewati periode rigor mortis (kaku) segera dinekropsi dan organ serta jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup dinekropsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ dan jaringan. Selain itu juga dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis dan histopatologi (30).

2.4.1.2 Uji Toksisitas Khusus

a) Uji Teratogenik

Teratogen merupakan suatu zat yang menyebabkan kerusakan pada janin atau embrio selama kehamilan, yang menyebabkan cacat lahir sementara ibu tidak menunjukkan tanda toksisitas (13). Uji teratogenisitas adalah suatu pengujian untuk memperoleh informasi adanya abnormalitas fetus yang terjadi karena pemberian sediaan uji selama masa pembentukan organ fetus (masa organogenesis). Informasi tersebut meliputi abnormalitas bagian luar fetus (morfologi), jaringan lunak serta kerangka fetus. Prinsip uji teratogenisitas adalah pemberian sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis pada beberapa kelompok hewan bunting selama paling sedikit masa organogenesis dari kebuntingan, satu dosis per kelompok. Satu hari sebelum waktu melahirkan induk dibedah, uterus diambil dan dilakukan evaluasi terhadap fetus (30).

b) Uji Mutagenik

Mutagen adalah zat yang mengubah informasi genetik suatu organisme, biasanya dengan mengubah DNA. Mutagen biasanya juga karsinogen karena mutasi sering menyebabkan kanker. Contoh mutagen termasuk etidium bromida, formaldehid, dioksan dan nikotin (13).

Pengujian mutagenisitas digunakan untuk menilai perubahan submikroskopik dalam urutan dasar DNA, penyimpangan kromosom dan penyimpangan struktural

dalam DNA termasuk duplikasi, penyisipan, inversi dan translokasi. Mutasi jenis tertentu mengakibatkan karsinogenesis (perubahan pada protoonkogen) mutasi gen supresor tumor) dan sebagainya penentuan mutagenisitas sangat penting dalam obat proses pengembangan (33).

c) Uji Karsinogenik

Uji karsinogenisitas adalah suatu pengujian untuk mendeteksi dan memperoleh informasi/ mengidentifikasi sifat karsinogenik sediaan setelah mempersembahkan sediaan uji dengan dosis yang diberikan pada hewan uji selama sebagian besar rentang hidup hewan tersebut sesuai dengan rute pemberian yang diinginkan (30).

Tes dilakukan pada sebagian besar umur hewan. Setelah paparan zat uji, hewan percobaan diamati untuk tanda-tanda toksisitas dan perkembangan tumor. Jika ini tidak ditemukan, tes dapat dihentikan setelah 18 bulan dalam kasus tikus dan hamster dan setelah 24 bulan dengan tikus. Jika hewan sehat, analisis hematologi dilakukan setelah 12 bulan dan 18 bulan dan penelitian dihentikan. Hewan dikorbankan dan perubahan patologis berat dicatat dan studi histopatologi dilakukan pada semua jaringan (33).

Prinsip uji karsinogenisitas adalah sediaan uji pada beberapa tingkat dosis yang diberikan kepada beberapa kelompok hewan selama sebagian besar rentang hidup hewan tersebut sesuai dengan rute pemberian yang diinginkan. Hewan diamati dengan cermat terhadap tanda-tanda toksisitas dan perkembangan lesi neoplastik. Hewan yang mati selama pengujian dinekropsi. Hewan yang masih hidup sampai akhir penelitian dikorbankan dan dinekropsi (30).

2.5 Lethal Dose 50 (LD50)

LD50 (median lethal oral dose) adalah dosis tunggal zat yang diturunkan secara statistik yang dapat menyebabkan kematian pada 50 persen hewan bila diberikan melalui rute oral. Nilai LD50 dinyatakan dalam berat bahan uji per satuan berat hewan uji (mg/kg) (34)

LD50 penting untuk memprediksi dosis mematikan pada manusia dan untuk prediksi gejala keracunan setelah overdosis akut pada manusia. Nilai LD50 adalah dasar dari mana dosis lain dapat dirancang dalam eksperimen toksisitas subakut dan

kronis. Berdasarkan nilai LD50, derajat toksisitas zat dapat diklasifikasikan: LD50 sebesar 1 mg/kg atau kurang (sangat beracun); 1 50 mg/kg (sangat beracun); 50 500 mg/kg (cukup beracun); 500 5000 mg/kg (sedikit beracun); 5000 15.000 mg/kg (praktis tidak beracun); lebih dari 15.000 mg/kg (relatif tidak berbahaya) (11)

Pengujian ini juga memberi informasi tentang organ sasaran yang mungkin dirusak dan efek toksik spesifiknya, serta membantu dalam menentukan dosis yang aman bila digunakan dalam rentang waktu yang lebih lama. Prosedur dalam penentuan nilai LD50 diantaranya *Fixed Dose Method*, *Acute Toxic Class* dan *Up and Down*. Penggunaan metode-metode ini telah menyebabkan peningkatan yang signifikan dalam kesejahteraan pengujian menggunakan hewan uji (30)

Penentuan kategori toksisitas untuk bahan pangan, obat, obat tradisional, suplemen kesehatan dan bahan lainnya (*Generally Recognized As Safe/GRAS*) menurut nilai LD50 digunakan pedoman klasifikasi seperti pada Tabel

Tabel 1. Klasifikasi nilai LD50

Tingkat Toksisitas	LD ₅₀ Oral	Kasifikasi
1	≤ 5 mg/kg	Super Toksik
2	5-50 mg/kg	Sangat Toksik
3	> 50-500 mg/kg	Toksik
4	> 500-2000 mg/kg	Toksik Sedang
5	> 2000-5000 mg/kg	Toksik Ringan
6	> 5000 mg/kg	Tidak Toksik

Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap nilai LD50 sangat bervariasi antara jenis yang satu dengan jenis yang lain dan antara individu yang satu dengan individu yang lain dalam satu jenis. Beberapa faktor tersebut antara lain:

a) Spesies

Strain dan keragaman individu Setiap spesies dan strain yang berbeda memiliki sistem metabolisme dan detoksikasi yang berbeda. Setiap spesies mempunyai perbedaan kemampuan bioaktivasi dan toksikasi suatu zat. Tingginya tingkat keragaman suatu spesies dapat menyebabkan perbedaan nilai LD50.

b) Perbedaan jenis kelamin

Perbedaan jenis kelamin mempengaruhi toksisitas akut yang disebabkan oleh pengaruh langsung dari kelenjar endokrin. Hewan betina mempunyai sistem hormonal yang berbeda dengan hewan jantan sehingga menyebabkan perbedaan kepekaan terhadap suatu toksikan. Hewan jantan dan betina dari strain dan spesies yang sama biasanya bereaksi terhadap toksikan dengan cara yang sama, tetapi ada perbedaan kuantitatif yang menonjol dalam kerentanan.

c) Umur

Hewan yang lebih muda memiliki kepekaan yang lebih tinggi terhadap obat karena enzim untuk biotransformasi masih kurang dan fungsi ginjal belum sempurna. Fungsi biotransformasi dan ekskresi pada hewan yang lebih tua mengalami penurunan sehingga kepekaannya terhadap obat juga meningkat.

d) Berat badan

Penentuan dosis dalam pengujian toksisitas akut dapat dipengaruhi oleh berat badan. Perbedaan berat badan dalam satu spesies dapat menyebabkan perbedaan nilai LD50 karena semakin besar berat badan maka jumlah dosis yang diberikan juga semakin besar.

e) Cara pemberian

LD50 juga dapat dipengaruhi oleh cara pemberian. Pemberian obat peroral tidak langsung didistribusikan ke seluruh tubuh. Pemberian obat atau toksikan peroral didistribusikan ke seluruh tubuh setelah terjadi penyerapan di saluran cerna sehingga mempengaruhi kecepatan metabolisme suatu zat di dalam tubuh.

f) Kesehatan hewan

Status hewan dapat memberikan respon yang berbeda terhadap suatu toksikan. Kesehatan hewan sangat dipengaruhi oleh kondisi hewan dan lingkungan. Hewan yang tidak sehat dapat memberikan nilai LD50 yang berbeda dibandingkan dengan nilai LD50 yang didapatkan dari hewan sehat.

g) Faktor lingkungan

Salah satu faktor lingkungan yang mempengaruhi toksisitas akut adalah temperatur. Perbedaan temperatur suatu tempat akan mempengaruhi keadaan fisiologis suatu hewan.

h) Diet

Komposisi makanan hewan percobaan dapat mempengaruhi nilai LD50 suatu zat karena komposisi makanan akan mempengaruhi status kesehatan hewan percobaan (35). Kebutuhan pakan seekor mencit kurang lebih sebanyak 10% (pakan kering) dari bobot tubuhnya perhari. Seekor mencit dewasa dapat memakan 3-5 gr per hari. Sementara itu, kebutuhan minum seekor mencit kira-kira 15 – 30 mL air per hari. Namun banyak peneliti yang memberikan pakan dan minum secara ad libitum tanpa diperhitungkan jumlah perhewan per harinya dan frekuensi pemberian dilakukan satu kali sehari (36). Pakan ideal mencit harus memenuhi kebutuhan zat makanan antara lain protein 12%, lemak 5% dan serat kasar kira-kira 5%, harus cukup mengandung vitamin A, vitamin D, asam linoleat, tiamin, riboflavin, pantotenat, vitamin B12, biotin, piridoksin dan cholin (37).

2.5.1 Metode Penentuan LD50

1) Farmakope Indonesia

Terdapat beberapa syarat yang harus dipenuhi dalam menentukan nilai LD50 menggunakan metode Farmakope Indonesia Edisi III. Syarat-syarat tersebut diantaranya menggunakan seri dosis dengan pengenceran berkelipatan tetap, jumlah hewan uji dalam setiap kelompok harus sama dan dosis yang diberikan diatur sedemikian rupa sehingga sediaan uji menghasilkan efek dari 0% hingga 100%. LD50 dihitung dengan rumus: (38).

$$m = a - b \left(\sum p_i - 0,5 \right)$$

Keterangan:

M = log LD50

a = logaritma dosis terendah yang masih menyebabkan jumlah kematian 100% tiap kelompok

b = beda log dosis yang berurutan

pi = jumlah hewan yang mati setelah menerima dosis i, dibagi dengan jumlah hewan uji seluruhnya yang menerima dosis i

2) Aritmatik Reed dan Muench

Prinsip metode ini yaitu menggunakan nilai kumulatif. Nilai kumulatif disimpulkan dari asumsi bahwa hewan yang mati pada dosis tertentu akan mati juga

pada dosis yang lebih tinggi dan hewan yang masih hidup pada dosis tertentu akan bertahan juga pada dosis yang lebih rendah. Nilai kumulatif diperoleh dari menjumlahkan hewan uji yang mati karena pemberian dosis tertinggi yang menyebabkan 100% kematian dan hewan uji yang mati pada pemberian dosis-dosis lebih rendah. Nilai kumulatif survivor (hidup) diperoleh dari menjumlahkan hewan uji yang bertahan hidup pada pemberian dosis terendah yang 100% tidak menyebabkan kematian dan hewan uji yang bertahan hidup pada pemberian dosis-dosis yang lebih tinggi. Persentase hidup dihitung dari dosis-dosis yang berdekatan dengan LD50. Penentuan LD50 dapat dihitung dengan rumus: (38).

$$P.D = \frac{50\% - \%Kematian\ Tepat\ dibawah\ 50\%}{\%Kematian\ Tepat\ diatas\ 50\% - \%Kematian\ Tepat\ dibawah\ 50\%}$$

Keterangan:

P.D = Jarak proporsional

3) Thomson dan Weil

Penentuan nilai LD50 berdasarkan table yang dibuat oleh Thomson dan Weil telah digunakan sejak tahun 1952. Persyaratan yang harus diikuti dalam memilih metode ini diantaranya dalam setiap kelompok dosis digunakan hewan uji dalam jumlah yang sama, kelipatan dosis tetap dan jumlah kelompok dosis yang diujikan minimal 4 kelompok. Metode Thomson dan Weil sering diterapkan karena tingkat kepercayaan yang cukup tinggi dan tidak memerlukan banyak hewan uji. Penentuan nilai LD50 tidak memerlukan kertas probit logaritma dan uji heterogenitas. Hasil yang didapat lebih akurat karena metode ini dilengkapi daftar perhitungan LD50. Penentuan LD50 dapat dihitung dengan rumus: (38).

$$\log m = \log D + d(f + 1)$$

Keterangan:

m = nilai LD50

D = dosis terkecil yang digunakan

d = log dari kelipatan dosis

f = suatu nilai dalam table Thomson Weil

Rumus kisaran nilai LD50:

$$\log kisaran = \log LD50 \pm 2 d \delta f$$

Keterangan:

hewan dalam masing-masing kelompok dan selisih antar dosis untuk interval yang sama. Dosis yang lebih tinggi dari dosis yang menyebabkan kematian seluruh hewan uji dan dosis yang lebih rendah yang mampu ditolerir oleh seluruh hewan uji tidak dimasukkan dalam perhitungan. Jumlah perkalian didapatkan dari hasil kali selisih dosis dengan rata-rata kematian untuk interval yang sama. Nilai LD50 diperoleh dengan menggunakan rumus berikut: (38)

$$LD50 = a - (b/c)$$

Keterangan:

a = dosis terendah yang mengakibatkan kematian tertinggi dalam satu kelompok

b = jumlah perkalian antara selisih dosis dengan rata-rata kematian pada interval yang sama

c = jumlah hewan dalam satu kelompok

5) Grafik Miller-Tainter

Metode penentuan nilai LD50 menggunakan Grafik Miller dan tainter telah ada sejak tahun 1944. Metode ini umumnya dimanfaatkan dalam menghitung dosis efektif. Perhitungan nilai LD50 dalam metode grafik Miller dan Tainter memerlukan kertas probit logaritma yang dilengkapi skala logaritma dan probit. Skala logaritma sebagai absis dan skala probit sebagai ordinat. Skala dibuat dalam persen kemudian dikonversikan menjadi nilai probit dan sesuai dengan nilai probit yang ada dalam table probit. Hasil yang menunjukkan nilai probit 5 dijadikan sebagai nilai LD50 (38)

6) Metode Litchfield dan Wilcoxon

Metode Litchfield dan Wilcoxon mulai diterapkan dalam perhitungan nilai LD50 pada tahun 1949. Metode ini sering digunakan dalam penentuan dosis efektif. Dosis efektif (ED 50) ditentukan dengan menggunakan grafik sehingga didapatkan nilai tengahnya dan kurva persentase dosis. Penentuan nilai LD50 terdiri dari tingkat data dan range data dosis yang akan diujikan. Untuk melihat apakah hipotesis yang diajukan diterima atau ditolak, maka dilakukan perbandingan tingkat data dengan suatu nilai. Namun dalam penggunaannya, metode ini memerlukan banyak table dan monogram. Selain itu diperlukan heterogenitas data yang ditentukan dengan uji chi square (38).

7) Metode Trevan

Sejak tahun 1972 metode trevan mulai digunakan dalam penentuan LD50. Pengujian menggunakan metode ini tergolong sederhana, namun memerlukan hewan uji dalam jumlah besar untuk mendapatkan hasil yang akurat. Beberapa tingkat dosis ditentukan terlebih dahulu dan pengamatan dilakukan 24 jam setelah pemberian sediaan uji. Kematian pada setiap tingkatan dosis dihitung dalam bentuk persen. Persen kematian dihubungkan dengan log dosis sehingga nantinya akan didapatkan kurva berbentuk sigmoid. Nilai LD50 ditentukan dengan menarik garis dari bilangan 50% pada sumbu Y dan diplotkan pada sumbu X. Titik potong pada sumbu y merupakan nilai LD50 dari bahan uji (38)

2.5.2 Ketentuan Umum pada Uji Toksisitas

Menurut BPOM (2020), ketentuan-ketentuan umum pada uji toksisitas diantaranya:

a. Persetujuan Komisi Etik

Pada setiap uji yang menggunakan hewan harus mendapatkan Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*) dari Komisi Etik untuk hewan sebelum protokol pengujian dimulai (30).

b. Sediaan Uji

Hasil uji toksisitas tergantung pada sifat zat yang diuji. Sediaan uji dapat berupa zat yang mudah larut atau tersuspensi dalam air atau dapat larut dalam minyak, yang dapat berasal dari tanaman, hewan maupun hasil sintesis organik. Sediaan uji yang berupa simplisia tanaman obat memerlukan informasi diantaranya: nama latin dan nama daerah tanamana, deskripsi daerah tanaman, bagian tanaman yang digunakan, pemerian simplisia, cara pembuatan dan penanganan simplisia dan kandungan kimia simplisia (30).

c. Penyiapan Sediaan Uji

Sediaan uji dapat berupa bahan baku atau produk jadi yang terstandarisasi, baik dalam bentuk bahan tunggal maupun dalam kombinasi sesuai dengan komposisinya. Sediaan uji dapat dibuat dengan bermacam-macam cara, sesuai dengan sifat sediaan uji dan cara pemberiannya. Jika ingin memformulasikan sediaan dalam media cair, maka harus dilarutkan dalam cairan pembawa yang inert.

Sediaan uji yang larut air sebaiknya dilarutkan dalam air. Sedangkan untuk sediaan uji yang sukar larut air atau tidak larut air dapat disuspensikan atau diemulsikan dengan pelarut/ agen pensuspensi/ agen pengemulsi yang sesuai misalnya CMC (carboxy methyl cellulose) 0,3 – 1,0 %, minyak nabati (misalnya minyak zaitun, minyak wijen dan minyak jagung) atau pelarut lain yang lazim digunakan. Sediaan uji dapat diberikan secara langsung tanpa dilarutkan pada cairan pembawa bila sudah dalam bentuk cairan (30).

d. Volume Pemberian Sediaan Uji Secara Oral

Jumlah volume maksimal pemberian sediaan yang dapat diberikan tergantung pada berat badan hewan uji. Pada hewan pengerat/rodensia, jumlah normalnya 1 ml/100 g berat badan, namun bila pelarutnya air dapat diberikan hingga 2 ml/100 g berat badan. Volume maksimal pemberian sediaan uji secara oral adalah 5 ml untuk tikus dan 1 ml untuk mencit. Volume tersebut bila digunakan air sebagai media pembawanya. Bila menggunakan minyak sebagai pembawa, volume pemberian dengan jumlah normal 0,4ml/100 g berat badan dan apabila menggunakan pelarut lain maka karakteristik toksisitas cairan pembawa harus diketahui dengan jelas (30).

e. Dosis Uji

Umumnya dosis yang diberikan pada hewan uji setara dengan dosis penggunaan yang lazim pada manusia. Dosis lain meliputi dosis dengan faktor perkalian tetap yang mencakup dosis yang setara dengan dosis penggunaan lazim pada manusia sampai mencapai dosis yang dipersyaratkan untuk tujuan pengujian atau sampai batas dosis tertinggi yang masih dapat diberikan pada hewan uji (30).

Namun, pada uji toksisitas akut, sehubungan dengan tujuan utama uji toksisitas akut adalah mencari LD50 sehingga dosis awal yang digunakan memang yang menimbulkan efek toksik ringan berdasarkan informasi awal atau apabila tidak tersedia informasi menggunakan dosis sesuai yang direkomendasikan. Sekurang-kurangnya digunakan 3 tingkatan dosis. Dosis terendah adalah dosis tertinggi yang sama sekali tidak menimbulkan kematian, sedangkan dosis tertinggi adalah dosis terendah yang menimbulkan kematian 100 %. Dengan interval dosis yang mampu menghasilkan rentang toksisitas dan angka kematian. Dari data ini

akan diperoleh suatu kurva dosis-respon yang dapat digunakan untuk menghitung nilai LD50 (30).

f. Kelompok Kontrol

Pada setiap pengujian digunakan kelompok kontrol yang diberi pelarut/pembawa sediaan uji dan digunakan juga kelompok kontrol tanpa perlakuan tergantung dari jenis uji toksisitas (30).

g. Cara Pemberian Sediaan Uji

Pada dasarnya pemberian sediaan uji harus sesuai dengan cara pemberian atau pemaparan yang diterapkan pada manusia misalnya peroral (PO), topikal, injeksi intravena (IV), injeksi intraperitoneal (IP), injeksi subkutan (SK), injeksi intrakutan (IK), inhalasi, melalui rektal dan rute lainnya (30).

h. Hewan Uji

Pada prinsipnya jenis hewan yang digunakan untuk uji toksisitas harus dipertimbangkan berdasarkan sensitivitas, cara metabolisme sediaan uji yang serupa dengan manusia, kecepatan tumbuh serta mudah tidaknya cara penanganan sewaktu dilakukan percobaan. Hewan pengerat merupakan jenis hewan yang memenuhi persyaratan tersebut diatas, sehingga paling banyak digunakan pada uji toksisitas. Hewan yang digunakan harus sehat, asal, jenis dan galur, jenis kelamin, usia, serta berat badan harus jelas. Biasanya digunakan hewan muda dewasa dengan variasi bobot tidak lebih dari 20%. Adapun kriteria hewan yang digunakan dapat dilihat pada tabel 1. Namun, kriteria umur hewan uji dapat menyesuaikan dengan kebutuhan pengujian toksisitas yang akan dilakukan (30).

Tabel 3. Kriteria Hewan Uji

Jenis Hewan	Bobot Minimal	Rentang Umur
Mencit	20 g	6 – 8 minggu
Tikus	120 g	6 – 8 minggu
Marmut	250 g	4 – 5 minggu
Kelinci	1800 g	8 – 9 minggu

i. Kondisi Ruangan dan Pemeliharaan Hewan Uji

Ruangan yang digunakan untuk pengujian hendaknya memenuhi persyaratan suhu, kelembaban, cahaya dan kebisingan yang sesuai dengan kebutuhan hidup hewan uji, yaitu suhu ruangan diatur menjadi $22^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$, dengan kelembaban relatif 30–70% dan penerangan 12 jam terang 12 jam gelap. Ruangan harus selalu dijaga kebersihannya. Hewan diberi pakan dan minum yang sesuai standar laboratorium dan diberikan ad libitum kecuali tujuan penelitian yang memerlukan pakan khusus atau pembatasan asupan pangan. Hewan dipelihara dalam kandang yang terbuat dari material yang kedap air, kuat dan mudah dibersihkan. Ruang pemeliharaan bebas dari kebisingan (30).

j. Randomisasi dan Cara Penandaan Hewan Uji

Hewan uji dilakukan randomisasi dengan secara acak dimasukkan ke dalam setiap kelompok sesuai dengan pengelompokan hewan uji. Setelah pengacakan, tidak ada perbedaan yang signifikan dalam rata-rata berat badan antar kelompok. Setiap hewan diberi nomor identifikasi unik dan diberi tanda secara permanen. Penandaan hewan uji dapat dilakukan dengan cara memberikan penanda yang sesuai (misalnya penanda yang tidak toksik atau food grade) atau larutan asam pikrat 10% dalam alkohol. Penandaan dilakukan dengan tujuan membedakan antara hewan satu dengan yang lainnya (30).

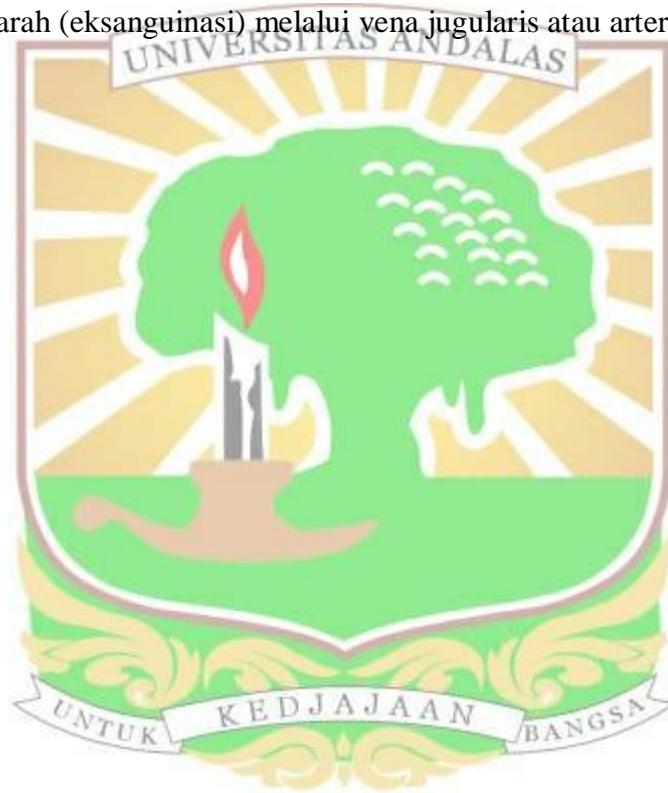
k. Cara Memegang (Handling) Hewan Uji

Cara memegang hewan uji jenis rodensia berbeda antara tikus dan mencit pada saat pemberian sediaan uji secara oral. Pemegangan yang benar sangat diperlukan sewaktu pemberian sediaan uji, karena pemegangan yang salah dapat berakibat fatal. Cara pemegangan yang salah dapat menyebabkan sediaan uji tidak masuk ke dalam lambung tetapi masuk ke dalam paru-paru, sehingga mengakibatkan kematian hewan uji. Disisi lain, pemegangan yang salah juga dapat mengakibatkan terjadinya kecelakaan kerja seperti tergigit oleh hewan (30).

l. Cara Mengorbankan Hewan Uji

Kematian hewan tidak dipersyaratkan sebagai parameter akhir yang mutlak dan harus dicapai dalam uji toksisitas. Hewan yang menunjukkan rasa nyeri, sakit dan distress dapat dikorbankan lebih dulu (tanpa menunggu kematian) sesuai prinsip kesejahteraan hewan (humane endpoint). Hewan yang dikorbankan dalam kondisi

tersebut dihitung sebagai hewan mati yang berkaitan dengan pemberian sediaan uji. Sebelum hewan uji dikorbankan, dilakukan anestesi terlebih dahulu. Hewan dipegang secara hati-hati tanpa menimbulkan rasa takut, lalu hewan dikorbankan dengan salah satu teknik di tempat terpisah dari hewan lain dan dijaga agar tidak ada hewan hidup disekitarnya. Pengorbanan hewan uji harus dilakukan oleh personil yang kompeten dan disertai proses konfirmasi untuk memastikan kematian. Teknik mengorbankan hewan uji yang umum dilakukan antara lain cara dislokasi leher untuk hewan kecil seperti mencit dan tikus dengan berat badan kurang dari 200 gram, cara anestesi secara inhalasi dengan obat bius dan cara pengeluaran darah (eksanguinasi) melalui vena jugularis atau arteri karotis (30).



BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama ± 4 bulan di Laboratorium Sentral, Laboratorium Farmakologi dan *Animal House* Fakultas Farmasi Universitas Andalas

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Rotary evaporator (Buchi R-210 Rotavapor), corong pisah, oven (Memmert), furnace, timbangan analitik (SF-400), desikator, lumpang dan alu, krus porselen, *Moisture Analyzer*, Hot plate, Uv-Visible lamp (Camag), botol gelap, corong, botol infus (500 ml dan 100 ml), beaker glass (Pyrex), plat tetes, rak dan tabung reaksi, gelas ukur (Pyrex), labu ukur, spatel, batang pengaduk, pipet tetes, pot salep, kaca objek, chamber KLT, pipa kapiler, spuit, sonde, kandang hewan, tempat makan dan minum hewan.

3.2.2 Bahan

Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack.), etanol 70%, n-heksana, etil asetat, aquades, Na CMC 0.5%, kuersetin, reagen fitokimia, kertas saring, HCL encer, fase gerak KLT (metanol dan etil asetat), kertas saring whatman, aluminium foil, plat KLT Silica gel, makanan standar mencit.

3.2.3 Hewan Percobaan

Hewan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan yang sehat berumur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 g serta belum pernah digunakan untuk percobaan sebanyak 100 ekor. Sebelum penelitian mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Lokasi Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sungkai yang diambil di rumah potong hewan Pemko Padang, Aie Pacah, Kecamatan Koto Tangah, Kota Padang, Sumatera Barat.

3.3.2 Identifikasi Tumbuhan

Identifikasi tumbuhan Sungkai dilakukan di Herbarium ANDA Jurusan Biologi Fakultas MIPA Unand.

3.3.3 Pembuatan Simplisia

Daun sungkai segar sebanyak 4 kg disortasi dan dicuci hingga bersih kemudian dikering anginkan selama 7 hari atau sampai daun bisa diremukkan. Setelah kering, lakukan sortasi kembali untuk memastikan sampel terbebas dari pengotor yang masih tertinggal. Sampel kering yang telah disortasi ini kemudian dirajang menggunakan grinder dan ditimbang, didapatkan 1 kg serbuk simplisia.

3.3.4 Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi menggunakan metode maserasi dilakukan dengan merendam 1 kg bagian serbuk halus simplisia yang ditambahkan 10 bagian pelarut etanol 70% kedalam botol yang berwarna gelap sebagai wadah maserasi. Campuran diaduk sesekali selama 6 jam pertama, dibiarkan selama 18 jam, kemudian disaring. Ulangi proses tersebut sebanyak dua kali dengan perbandingan serbuk dan pelarut yang sama. Semua meserat dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental (39).

3.3.5 Pembuatan Fraksi

Ditimbang ekstrak etanol daun sungkai sebanyak 150 g kemudian dilarutkan dalam 500 ml aquadest hangat, kocok hingga homogen. Perbandingan antara volume air dan pelarut organik yang dimasukkan ke dalam corong pisah yaitu 1:1, sehingga diikuti dengan penambahan n-heksana 500 ml. Dilakukan pengocokkan secara perlahan, pastikan membuka penutup sesekali untuk mencegah terjadinya

bumping. Lalu diamkan selama 30 menit hingga terbentuk dua lapisan, lapisan atas n-heksana dan lapisan bawah air. Kemudian pisahkan kedua lapisan dan diulangi proses ini sebanyak tiga kali (40).

Selanjutnya masukkan kembali *aquadest* ke dalam corong pisah, tambahkan etil asetat sebanyak 500 ml. Dengan langkah yang sama seperti n-heksan, terbentuk dua lapisan, fraksi etil dibagian atas dan fraksi air dibagian bawah. Lalu diamkan selama 30 menit hingga terbentuk dua lapisan, lapisan atas etil asetat dan lapisan bawah air. Kemudian pisahkan kedua lapisan dan diulangi proses ini sebanyak tiga kali. Fraksi n-heksan, fraksi etil dan fraksi air yang terbentuk dipisahkan dengan *rotary evaporator* (40).

3.3.6 Penentuan Rendemen

Penentuan rendemen dilakukan dengan cara menimbang daun sungkai yang telah dibersihkan (A), ekstrak kental yang diperoleh ditimbang kembali (B). Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak. Penentuan rendemen dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut: (40).

$$\text{Rendemen} = \frac{B}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = berat ekstrak (gram)

B = berat fraksi yang diperoleh (gram)

3.3.7 Standarisasi Fraksi

A. Parameter Non Spesifik

1) Susut Pengerinan

Ekstrak ditimbang sebanyak 1 sampai 2 gram dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105 ° C selama 30 menit dan ditara. Ratakan ekstrak dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol atau dengan bantuan batang pengaduk hingga membentuk lapisan setebal lebih kurang 5 sampai 10 mm. Masukkan botol yang berisi ekstrak ke dalam oven, buka tutupnya, keringkan pada suhu 105 ° C hingga bobot konstan.

Sebelum setiap pengeringan, biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin di dalam desikator hingga suhu ruang. Catat hasil penimbangan dan hitung susut pengeringannya menggunakan persamaan berikut: (21).

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{(W1 - W0) - (W2 - W0)}{W1 - W0} \times 100\%$$

Keterangan:

W0= Berat botol timbang kosong

W1= Berat botol timbang + ekstrak

W2= Berat botol timbang + hasil pengeringan

2) Kadar Abu Total

Ekstrak ditimbang sebanyak 2 sampai 3 gram kemudian dimasukkan ke dalam krus yang telah dipijarkan dan ditara. Ratakan ekstrak lalu pijarkan menggunakan tanur pada suhu $800 \pm 25^\circ \text{C}$ hingga arang habis, dinginkan dan timbang. Jika prosedur ini tidak dapat menghilangkan arang, tambah air panas, saring dengan kertas saring bebas abu. Pijarkan kembali beserta kertas saringnya dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot konstan, kemudian timbang. Catat hasil penimbangan dan hitung kadar abu total menggunakan persamaan berikut: (39).

$$\text{Kadar Abu Total} = \frac{W2 - W0}{W1 - W0} \times 100\%$$

Keterangan:

W0= Berat krus kosong

W1= Berat krus + ekstrak

W2= Berat krus + hasil pemijaran

B. Parameter Spesifik

a. Uji Organoleptis

Penggunaan panca indra untuk mendeskripsikan bentuk, warna, rasa dan bau dari ekstrak yang diperoleh (21).

b. Uji Fitokimia

1.) Alkaloid

Timbang fraksi ekstrak sebanyak 500 mg, tambahkan 1 mL HCL 2N dan 9 mL air kemudian panaskan diatas penangas air selama 2 menit, biarkan hingga

dingin lalu saring. Masukkan masing-masing 3 tetes filtrat ke dalam dua lobang plat tetes. Penambahan reagen Mayer akan membentuk endapan berwarna putih. Jika dengan reagen Dragendorf akan membentuk endapan jingga kecoklatan (41).

2.) Flavonoid

Timbang fraksi ekstrak sebanyak 50 mg masukkan dalam tabung reaksi dan larutkan dengan 1-2 mL etanol. Kemudian tambahkan 100 mg logam Mg atau serbuk Magnesium P dan 10 tetes HCl P. Terbentuknya warna merah jingga hingga merah ungu menunjukkan reaksi positif adanya flavon dan auron, serta terdapatnya flavonoid pada ekstrak (41).

3.) Fenolik

Timbang fraksi ekstrak sebanyak 50 mg dan masukkan dalam lobang plat tetes. Tambahkan 2 tetes $FeCl_3$ 5%. Terbentuknya warna hijau atau hijau biru menunjukkan reaksi positif adanya fenolik (41).

4.) Saponin

Timbang fraksi ekstrak sebanyak 500 mg dan masukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 10 mL air panas, biarkan hingga dingin, kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik. Reaksi positif menunjukkan adanya buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama 10 menit atau lebih. Buih tidak hilang bila ditambahkan 1 tetes HCl 2N (41).

5.) Terpenoid dan Steroid

Timbang fraksi ekstrak sebanyak 50 mg masukkan ke dalam tabung reaksi dan larutkan dalam 0,5 mL kloroform dan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Tambahkan 1-2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan reaksi positif adanya triterpenoid. Apabila terbentuk warna hijau kebiruan maka reaksi positif adanya steroid (41)

c. Pola Kromatografi

1.) Penjenuhan Bejana

Tempatkan kertas saring pada dasar bejana kromatografi. Tinggi dan lebar kertas saring harus sama dengan tinggi dan lebar bejana. Tambahkan sejumlah fase gerak yang akan digunakan untuk pengujian yaitu metanol:etil asetat dengan perbandingan 6:4. Pastikan kertas saring selalu terbasahi oleh fase gerak pada

bagian dasar bejana. Tutup rapat bejana lalu biarkan hingga fase gerak membasahi seluruh bagian kertas saring (39).

2.) Larutan Uji

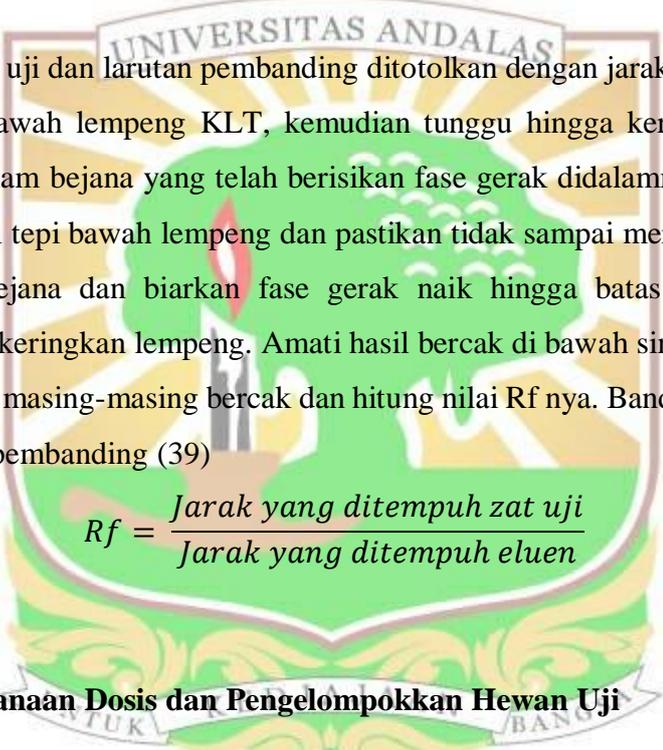
Timbang sebanyak 0.5 g ekstrak dan larutkan dalam etanol 70% di dalam labu ukur 10 mL. Biarkan selama 10 menit kemudian saring (39)

3.) Larutan Pembanding

Timbang sebanyak 10 mg Quersetin dan masukkan dalam labu ukur 10 mL Larutkan dalam etanol P sampai tanda batas dan biarkan selama 10 menit kemudian saring (39)

4.) KLT

Larutan uji dan larutan pembanding ditotolkan dengan jarak lebih kurang 1 cm dari tepi bawah lempeng KLT, kemudian tunggu hingga kering. Masukkan lempeng ke dalam bejana yang telah berisikan fase gerak didalamnya. Fase gerak harus mencapai tepi bawah lempeng dan pastikan tidak sampai merendam totolan. Tutup rapat bejana dan biarkan fase gerak naik hingga batas atas lempeng. Keluarkan dan keringkan lempeng. Amati hasil bercak di bawah sinar UV-Vis 254 nm. Ukur jarak masing-masing bercak dan hitung nilai Rf nya. Bandingkan nilai Rf zat uji dengan pembanding (39)


$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat uji}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

3.3.8 Perencanaan Dosis dan Pengelompokan Hewan Uji

Terdapat lima varian dosis fraksi ekstrak etanol daun sungkai yang akan diberikan ke hewan uji, yaitu 1000 mg/kgBB, 2000 mg/kgBB, 4000 mg/kgBB, 8000 mg/kgBB. Hewan uji dikelompokkan menjadi 5 kelompok berdasarkan variasi dosis dan kontrol dengan pembagian seperti berikut

- Kelompok I : hanya diberikan Na CMC 0,5 %
- Kelompok II : diberikan ekstrak dosis 1.000 mg/kgBB
- Kelompok III : diberikan ekstrak dosis 2.000 mg/kgBB
- Kelompok IV : diberikan ekstrak dosis 4.000 mg/kgBB
- Kelompok V : diberikan ekstrak dosis 8.000 mg/kgBB

Jumlah hewan yang akan diujikan tiap fraksi 25 ekor mencit putih jantan dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor

3.3.9 **Penyiapan Hewan Uji**

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) galur *Swiss Webster* berumur 6 sampai 8 minggu dengan berat badan minimal 20 g. Sebelum diberikan perlakuan, mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama 5 sampai 7 hari. Mencit diberi pakan dan minum secara *ad libitum*. Aklimatisasi ini berguna untuk penyesuaian kondisi dan lingkungan, mengontrol kesehatan dan berat badan hewan uji. Hewan yang dipilih untuk pengujian nantinya adalah mencit yang sehat dengan variasi berat badan selama diaklimatisasi tidak lebih dari 10% dan menunjukkan perilaku yang normal secara visual (42)

3.3.10 **Pembuatan Sediaan Uji**

Fraksi yang telah ditimbang disuspensikan dalam Na CMC 0,5%. Timbang Na CMC sebanyak 50 mg masukkan ke dalam lumpang yang telah berisikan 1 mL air panas. Gerus hingga homogen lalu cukupkan dengan aquades sampai volume 10 mL. Suspensikan ekstrak dengan larutan Na CMC sesuai konsentrasi yang akan dibuat (43)

3.3.11 **Perlakuan terhadap Hewan Uji**

Mencit putih jantan sehat yang sebelumnya telah diaklimatisasi dibagi secara acak menjadi 5 kelompok yang masing-masing kelompoknya terdiri dari 5ekor. Sediaan uji diberikan sekali pada hari pertama berdasarkan berat badan mencit. Hewan uji diamati terhadap gejala toksisitas yang timbul hingga kematian dalam 24 jam. Pengamatan dilakukan secara intes pada hari pertama setiap 30 menit selama 6-8 jam, selanjutnya selama 4 jam secara berkala selama 14 hari. Berat badan mencit dimonitor sejak sebelum pemberian sediaan hingga hewan dikorbankan. Setelah 14 hari, hewan dikorbankan dengan cara pemberian anastesi (44).

3.3.12 Penimbangan Organ

Organ yang akan ditimbang adalah hati dan ginjal. Organ harus dikeringkan terlebih dahulu dengan kertas penyerap, kemudian segera ditimbang untuk mendapatkan bobot organ absolut. Bobot organ relatif dapat diperoleh dengan rumus berikut: (30).

$$\text{Bobot Organ Relatif} = \frac{\text{Bobot Organ Absolut}}{\text{Berat Badan}}$$

3.4 Analisis Data

Kematian hewan uji dalam setiap kelompok dianalisis menggunakan persamaan menurut Farmakope Indonesia Edisi III untuk mendapatkan nilai LD50. Sedangkan persentase perubahan berat badan dan berat organ dianalisis menggunakan program SPSS (Statistical Product and Service Solution). Data dianalisis dengan menggunakan uji One Way Anova untuk menentukan signifikansi statistik antar kelompok hewan uji, kemudian dilanjutkan dengan uji lanjutan Duncan.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental dengan teknik secara *in vivo* yang dilakukan untuk melihat keamanan fraksi daun sungkai dalam penggunaannya. Sampel yang digunakan adalah daun sungkai (*Peronema canescens* jack.) yang diambil dari Jalan Bukit Ngalau, Indarung, Kecamatan Lubuk Kilangan, Kota Padang, Sumatera Barat.

Identifikasi tanaman dilakukan di Herbarium ANDA Jurusan Biologi Fakultas MIPA Unand. Tujuan dilakukannya identifikasi tanaman ini adalah untuk mengetahui identitas sampel yang akan digunakan. Berdasarkan hasil identifikasi, sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sungkai (*Peronema canescens* jack) dari famili Verbenaceae.

Proses pembuatan ekstrak daun sungkai diawali dengan pengumpulan herba daun sungkai segar sebanyak 4 kg lalu disortasi basah untuk memisahkan dari pengotornya. Bagian tumbuhan yang telah disortasi kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering-anginkan. Proses pengeringan ini bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang awet dan dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Sampel dikatakan telah kering apabila sampel dapat diremukkan. Sampel kering ini kemudian dirajang menggunakan grinder dan didapatkan simplisia serbuk sebanyak 1 kg. Perajangan bertujuan untuk memperluas permukaan simplisia agar pelarut dapat berpenetrasi dengan mudah sehingga penarikan zat aktif menjadi lebih sempurna.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Maserasi dipilih karena pengerjaannya sederhana, tidak memerlukan perlakuan khusus, dapat menggunakan sampel dalam jumlah yang banyak dan tidak melalui proses pemanasan. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70% (50). Penggunaan etanol sebagai pelarut karena merupakan pelarut universal sehingga dapat melarutkan senyawa yang bersifat polar, semi polar dan non polar. Konsentrasi 70% digunakan karena sampel yang digunakan adalah sampel kering dimana kandungan airnya

sedikit. Kandungan air diperlukan untuk memecah dinding sel tanaman sehingga sari dari tanaman dapat keluar.

Fraksi ekstrak etanol dibuat dengan menimbang ekstrak etanol daun sungkai sebanyak 150 g kemudian dilarutkan dalam 500 ml aquadest hangat, kocok hingga homogen. Perbandingan antara volume air dan pelarut organik yang dimasukkan ke dalam corong pisah yaitu 1:1, sehingga diikuti dengan penambahan n-heksan 500 ml. Dilakukan pengocokkan secara perlahan, pastikan membuka penutup sesekali untuk mencegah terjadinya bumping. Lalu diamkan selama 30 menit hingga terbentuk dua lapisan, lapisan atas n-heksana dan lapisan bawah air. Kemudian pisahkan kedua lapisan dan diulangi proses ini sebanyak tiga kali (40).

Selanjutnya masukkan kembali *aquadest* ke dalam corong pisah, tambahkan etil asetat sebanyak 500 ml. Dengan langkah yang sama seperti n-heksan, terbentuk dua lapisan, fraksi etil dibagian atas dan fraksi air dibagian bawah. Lalu diamkan selama 30 menit hingga terbentuk dua lapisan, lapisan atas etil asetat dan lapisan bawah air. Kemudian pisahkan kedua lapisan dan diulangi proses ini sebanyak tiga kali. Fraksi n-heksan, fraksi etil dan fraksi air yang terbentuk dipisahkan dengan *rotary evaporator* (40).

4.1 Penentuan Rendemen

Proses maserasi daun sungkai dilakukan selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan menggunakan pelarut yang sama. Serbuk simplisia sebanyak 700 g direndam selama 3 hari sambil sesekali diaduk setiap harinya kemudian didiamkan. Saring menggunakan kertas saring dan meserat yang diperoleh dikumpulkan lalu diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental. *Rotary evaporator* bekerja dengan menurunkan tekanan pada permukaan sehingga mempercepat penguapan pelarut. Ekstrak kental daun sungkai yang diperoleh sebanyak 120,24 g dan rendemen ekstrak didapatkan sebanyak 17,17%.

$$\begin{aligned} \%Rendemen \text{ Ekstrak} &= \frac{\text{Berat Ekstrak yang didapat}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{120,12 \text{ g}}{700 \text{ g}} \times 100\% \end{aligned}$$

$$= 17,17\%$$

Fraksi n-heksan yang diperoleh dari 120,24 g ekstrak etanol daun sungkai setelah difraksinasi adalah 4,12 g

$$\begin{aligned} \%Rendemen \text{ Fraksi } n - \text{ heksan} &= \frac{\text{Berat Fraksi yang didapat}}{\text{Berat ekstrak kental}} \times 100\% \\ &= \frac{4,12 \text{ g}}{120,12 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 3,43\% \end{aligned}$$

Fraksi sisa yang diperoleh dari fraksinasi dengan n-heksan tadi dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan etil asetat, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi kental etil asetat sebanyak 4,56 g

$$\begin{aligned} \%Rendemen \text{ Fraksi etil asetat} &= \frac{\text{Berat fraksi yang didapat}}{\text{Berat ekstrak kental}} \times 100\% \\ &= \frac{4,56 \text{ g}}{120,12 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 3,79\% \end{aligned}$$

Selanjutnya fraksi sisa atau fraksi air yang diperoleh setelah fraksinasi menggunakan etil asetat tadi diuapkan menggunakan *rotary evaporator*, didapatkan berat fraksi kental air sebanyak 11,23 g, kemudian dihitung persen rendemennya.

$$\begin{aligned} \%Rendemen \text{ Fraksi air} &= \frac{\text{Berat fraksi yang didapat}}{\text{Berat ekstrak kental}} \times 100\% \\ &= \frac{11,23}{120,12} \times 100\% \\ &= 9,27\% \end{aligned}$$

Berdasarkan hasil hitungan rendemen diatas, dapat diketahui bahwa nilai rendemen tertinggi yaitu fraksi air daun sungkai dengan berat fraksi sebesar 11,21 g dengan persen rendemen 9,27%, lebih banyak dari fraksi n-heksan dan etil asetat.

Ini menunjukkan bahwa daun sungkai mengandung lebih banyak senyawa-senyawa yang bersifat polar.

Faktor-faktor yang mempengaruhi besar kecilnya nilai rendemen fraksi daun sungkai yaitu perbandingan jumlah sampel terhadap jumlah pelarut yang digunakan, jenis pelarut yang digunakan, jumlah simplisia dan lamanya waktu yang dibutuhkan pada proses ekstraksi (45).

Penentuan rendemen bertujuan untuk mengetahui banyaknya senyawa bioaktif yang terkandung dalam simplisia daun sungkai yang terekstraksi (51). Ekstrak yang didapatkan selanjutnya distandarisasi melalui pengujian parameter non spesifik dan spesifik. Standarisasi bertujuan untuk mendapatkan ekstrak yang aman dan terjamin mutunya.

Parameter non spesifik yang dilakukan pada penelitian ini meliputi susut pengeringan, kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam. Sedangkan parameter spesifik yang dilakukan meliputi organoleptis, uji fitokimia dan KLT.

4.2 Parameter Non Spesifik

4.2.1 Pemeriksaan Susut Pengeringan

Susut pengeringan merupakan salah satu karakterisasi ekstrak parameter non spesifik. Susut pengeringan dapat dikatakan sebagai tetapan dalam menentukan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang saat proses pemijaran. Dalam kata lain, senyawa yang dimaksud bukan hanya air melainkan senyawa-senyawa kimia lain. Ekstrak kental sungkai sebanyak 2 g yang telah ditempatkan dalam krus lalu dikeringkan dalam oven dengan suhu 105°C. Pengeringan ekstrak dilakukan selama lebih kurang 30 menit atau sampai didapatkan berat yang konstan (46). Replikasi susut pengeringan ekstrak dilakukan sebanyak tiga kali untuk melihat rata-ratanya.

Nilai susut pengeringan ekstrak etanol daun sungkai yang didapatkan dari rata-rata tiga kali pengulangan adalah 10,89%. Nilai ini menandakan bahwa ekstrak etanol daun sungkai memenuhi syarat karena berada dibawah batas maksimum susut pengeringan yang baik yaitu dibawah 11%.

Tabel 4. Hasil Penetapan Susut Pengerinan Ekstrak Etanol Daun Sungkai

No.	Kurs Kosong (g)	Kurs + sampel sebelum dipanaskan (g)	Kurs + sample sesudah dipanaskan (g)	Susut Pengerinan
1.	34,02	36,02	35,84	9,25 %
2.	21,76	23,77	23,54	11,45%
3.	31,54	33,56	33,32	11,98%
Rata-rata ± SD				10,89%

4.2.1 Penetapan Kadar Abu Total

Penetapan kadar abu total juga merupakan salah satu karakterisasi ekstrak parameter non spesifik. Penetapan kadar abu total bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Bahan dipijarkan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya dapat terdestruksi dan menguap, sehingga yang tertinggal unsur mineral dan anorganiknya saja (21).

Tabel 5. Hasil Penetapan Kadar Abu Simplisia Kering Daun Sungkai

No.	Kurs Kosong (g)	Kurs + sampel sebelum dipijar (g)	Kurs + sample sesudah dipijar (g)	Kadar Abu
1.	31,13	33,13	31,24	5,64%
2.	33,23	35,24	33,36	6,63%
3.	29,51	31,52	29,61	5,32%
Rata-rata				5,86%

Tabel 6. Hasil Penetapan Kadar Abu Ekstrak Etanol Daun Sungkai

No.	Kurs Kosong (g)	Kurs + sampel sebelum dipijar (g)	Kurs + sample sesudah dipijar (g)	Kadar Abu (%)
1.	31,12	33,13	31,26	6,74%
2.	34,01	36,03	34,15	6,67%
3.	33,23	35,24	33,36	6,63%
Rata-rata				6,68%

4.3 Parameter Spesifik

4.3.1 Pemeriksaan Organoleptik

Pemeriksaan organoleptis merupakan parameter spesifik dari uji karakteriasi ekstrak yang dilakukan terhadap ekstrak kental daun sungkai yang didapatkan. Pengujian organoleptis bertujuan sebagai pengenalan awal yang sederhana dan seobjektif mungkin dikarenakan pengujian ini hanya menggunakan panca indera untuk pemeriksaannya (21) Pemeriksaan dilakukan secara organoleptis untuk dapat menggambarkan warna, bau, rasa dan bentuk dari ekstrak kental daun sungkai (Tabel 7, Tabel 8, Tabel 9).

Tabel 7. Pemeriksaan Organoleptis Fraksi N-heksan

No	Pemeriksaan	Hasil
1	Warna	Hijau Kehitaman
2	Bau	Khas
3	Rasa	Pahit
4	Bentuk	Kental

Tabel 8. Pemeriksaan Organoleptis Fraksi Etil Asetat

No	Pemeriksaan	Hasil
1	Warna	Hijau Kehitaman
2	Bau	Aromatik
3	Rasa	Pahit
4	Bentuk	Kental

Tabel 9. Pemeriksaan Organoleptis Fraksi Air

No	Pemeriksaan	Hasil
1	Warna	Orange kehitaman
2	Bau	khas
3	Rasa	Pahit
4	Bentuk	Kental

4.3.2 Skrinning Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam fraksi ekstrak daun sungkai dengan mereaksikan ekstrak uji dengan pereaksi spesifiknya (47). Pada penelitian ini diuji beberapa golongan senyawa metabolit sekunder, diantaranya alkaloid, fenolik, saponin, flavonoid dan steroid terpenoid. Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan dengan menggunakan beberapa reagen spesifik yang diuraikan pada tabel didapatkan hasil ekstrak daun sungkai positif mengandung senyawa fenolik, flavonoid, saponin dan terpenoid.

Tabel 10. Hasil Uji Fitokimia Fraksi N-heksan Daun Sungkai

No	Pemeriksaan	Pereaksi	Hasil Pengamatan	Hasil
1	Alkaloid	Mayer	Tidak terbentuk endapan kuning atau putih	-
		Dragendorf	Tidak terbentuk endapan jingga	-
2	Flavonoid	Serbuk Mg dan HCl pekat	Terbentuk warna hijau kekuningan	+
3	Fenolik	FeCl ₃	Terbentuk warna hijau kehitaman	+
4	Saponin	Air panas dan HCl 2N	Terbentuk buih dan tidak hilang ketika ditetaskan HCL 2 N	+
5	Terpenoid & Steroid	Kloroform, asam asetat anhidrat dan H ₂ SO ₄ pekat	Tidak terbentuk warna hijau biru	-

Tabel 11. Hasil Uji Fitokimia Fraksi Etil Asetat Daun Sungkai

No	Pemeriksaan	Pereaksi	Hasil Pengamatan	Hasil
1	Alkaloid	Mayer	Terbentuk endapan kuning atau putih	+
		Dragendorf	Terbentuk endapan jingga	+
2	Flavonoid	Serbuk Mg dan HCl pekat	Terbentuk warna merah ungu	+
3	Fenolik	FeCl ₃	Terbentuk warna hijau kehitaman	+
4	Saponin	Air panas dan HCl 2N	Terbentuk buih dan tidak hilang ketika ditetaskan HCL 2 N	+
5	Terpenoid & Steroid	Kloroform, asam asetat	Tidak terbentuk warna hijau biru	-

		anhidrat dan H ₂ SO ₄ pekat		
--	--	---	--	--

Tabel 12. Hasil Uji Fitokimia Fraksi Air Daun Sungkai

No	Pemeriksaan	Pereaksi	Hasil Pengamatan	Hasil
1	Alkaloid	Mayer	Terbentuk endapan kuning atau putih	+
		Dragendorf	Terbentuk endapan jingga	+
2	Flavonoid	Serbuk Mg dan HCl pekat	Terbentuk warna merah ungu	+
3	Fenolik	FeCl ₃	Terbentuk warna hijau kehitaman	+
4	Saponin	Air panas dan HCl 2N	Terbentuk buih dan tidak hilang ketika ditetaskan HCL 2 N	+
5	Terpenoid & Steroid	Kloroform, asam asetat anhidrat dan H ₂ SO ₄ pekat	Tidak terbentuk warna hijau biru	-

Keterangan:

(+)= Mengandung senyawa metabolit sekunder

(-)= Tidak mengandung senyawa metabolit sekunder

4.3.3 Pemeriksaan Profil KLT

Kromatografi lapis tipis merupakan suatu teknik pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya. Pengujian profil KLT bertujuan untuk melihat keberadaan senyawa kimia yang terkandung pada suatu sampel dengan cara membandingkan pola noda dan nilai R_f sampel uji dengan pembanding yang berisi isolate senyawa murni(48). Pada plat KLT ditotolkan ekstrak etanol daun sungkai dan senyawa pembanding. Senyawa pembanding yang digunakan adalah quercetin yang merupakan senyawa dari golongan flavonoid. Seperti pada hasil skrining fitokimia Tabel fraksi ekstrak etanol daun sungkai positif memiliki kandungan

flavonoid, oleh karena itu digunakan quercetin sebagai pembanding. Selain itu alasan digunakannya quercetin sebagai pembanding karena termasuk golongan flavonoid glikosida dan merupakan senyawa flavonoid yang paling luas penyebarannya dalam tumbuhan daun sungkai.

a. Fraksi n-heksan

Pada pemeriksaan KLT Fraksi N-heksan digunakan eluen etil asetat : n-heksan : metanol (2:4:4)



Gambar 2. Hasil KLT fraksi n-heksan daun sungkai

Keterangan:

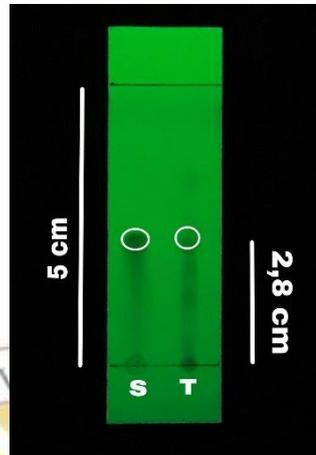
T = pembanding (kuersetin)

S = sampel (fraksi n-heksan daun sungkai)

Pada plat KLT diatas terdapat dua totolan, yaitu totolan sampel dan pembanding. Noda pada plat diamati di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm. Dari hasil yang didapatkan, jarak yang ditempuh antara noda sampel dan pembanding adalah sama yaitu 3,89 cm. Sedangkan jarak yang ditempuh eluen adalah 5 cm, maka didapatkan Rf fraksi n-heksan daun sungkai sebesar 0,78 cm.

b. Fraksi Etil Asetat

Pada pemeriksaan KLT Fraksi Etil Asetat digunakan eluen etil asetat : n-heksan (6:4)



Gambar 3. Hasil KLT fraksi etil asetat daun sungkai

Keterangan:

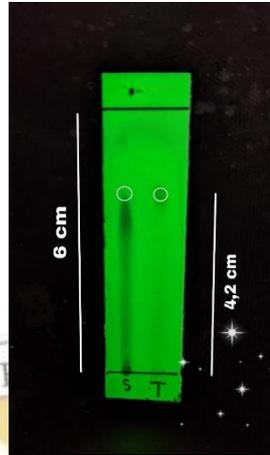
T = pembanding (kuersetin)

S = sampel (fraksi etil asetat daun sungkai)

Pada plat KLT diatas terdapat dua totolan, yaitu totolan sampel dan pembanding. Noda pada plat diamati di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm. Dari hasil yang didapatkan, jarak yang ditempuh antara noda sampel dan pembanding adalah sama yaitu 2,8 cm. Sedangkan jarak yang ditempuh eluen adalah 5 cm, maka didapatkan Rf fraksi n-heksan daun sungkai sebesar 0,56 cm.

c. Fraksi Air

Pada pemeriksaan KLT Fraksi Etil Asetat digunakan eluen metanol : n-heksan (8:2)



Gambar 4. Hasil KLT fraksi air daun sungkai

Keterangan:

T = pembanding (kuersetin)

S = sampel (fraksi air daun sungkai)

Pada plat KLT diatas terdapat dua totolan, yaitu totolan sampel dan pembanding. Noda pada plat diamati di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm. Dari hasil yang didapatkan, jarak yang ditempuh antara noda sampel dan pembanding adalah sama yaitu 4,2 cm. Sedangkan jarak yang ditempuh eluen adalah 6 cm, maka didapatkan Rf fraksi n-heksan daun sungkai sebesar 0,70 cm.

4.4 Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut oral merupakan uji yang dilakukan untuk memperoleh informasi mengenai efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji dalam waktu 24 jam secara oral dalam dosis tunggal atau berulang (32). Uji toksisitas akut dirancang untuk menentukan dosis letal doses (LD50) suatu zat dan memberikan petunjuk tentang dosis yang sebaiknya digunakan dalam pengujian yang lebih lama (49). LD50 merupakan dosis yang

dihitung secara statistik dan diharapkan mampu menyebabkan kematian 50% atau separuh dari populasi yang menerimanya. Secara umum, semakin kecil nilai LD50 maka semakin toksik senyawa tersebut dan semakin besar nilai LD50 maka semakin rendah toksisitasnya (49). Obat herbal yang akan diuji klinik memerlukan adanya data uji toksisitas dan minimal diperlukan data LD50 (10). Pengamatan terhadap hewan uji dilakukan selama 24 jam pertama dengan 4 jam intensif. Bila tidak terjadi kematian maka pengamatan dilanjutkan selama 14 hari. Parameter yang diamati meliputi gejala toksisitas yang timbul, persentase perubahan berat badan, kematian hewan uji dan rasio berat organ hati dan ginjal sebagai parameter akhir.

Pada penelitian ini hewan yang digunakan adalah mencit putih jantan galur swiss webster sebanyak 75 ekor yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan 20-35 g. Mencit putih dipilih sebagai hewan percobaan karena memiliki fisiologis yang mirip dengan manusia, mudah ditangani, dipelihara, mudah untuk didapatkan serta ekonomis. Mencit putih dengan jenis kelamin jantan dipilih karena memiliki hormon yang lebih stabil dibanding mencit betina. Untuk mengurangi hasil penyimpangan hasil penelitian, maka dipilih mencit dengan jenis kelamin yang sama, usia dan berat badan yang relatif sama (50). Sebelum diberi perlakuan, mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari agar mencit terbiasa dengan kondisi lingkungan percobaan yang baru dan tidak stres. Mencit yang dipilih untuk pengujian adalah mencit yang sehat dan tidak menunjukkan perubahan berat badan yang berarti yaitu lebih dari 10% selama proses aklimatisasi (42).

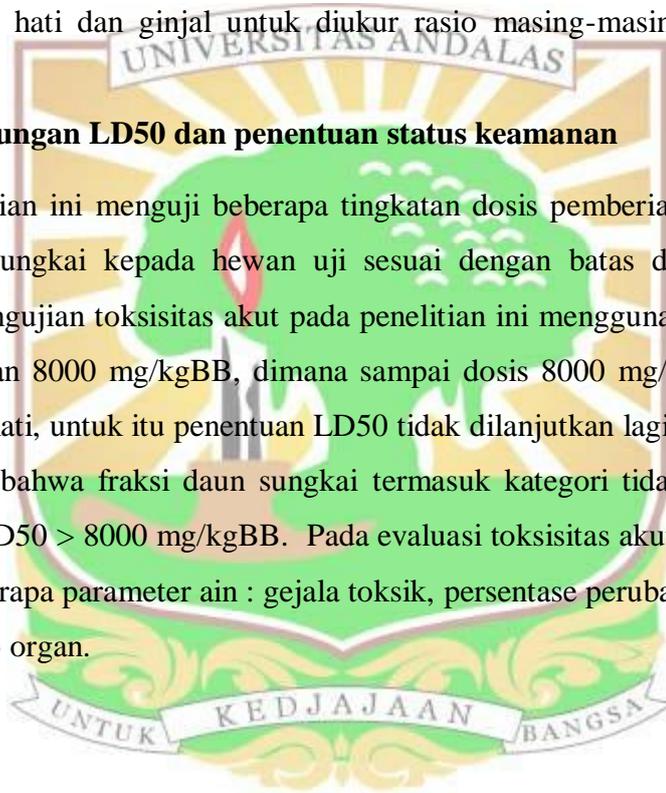
Mencit dikelompokkan menjadi 5 kelompok tiap fraksinya yang masing-masing kelompoknya terdiri dari 5 ekor mencit. Sebelum diberikan sediaan uji, mencit dipuaskan selama 3-4 jam namun air minum tetap diberikan (30). Mencit pada kelompok 1 hanya diberikan sediaan Na CMC 0,5 % (kelompok kontrol) dan mencit pada kelompok 2-5 diberikan sediaan uji yang disuspensikan dengan Na CMC 0,5%. Penggunaan Na CMC sebagai pensuspensi karena mudah didapatkan, bersifat inert, tidak toksik, tidak mengiritasi dan menghasilkan suspensi yang stabil (51). Fraksi daun sungkai sukar larut dalam air sehingga membutuhkan pensuspensi. Setelah diberikan sediaan uji, pakan boleh diberikan kembali setelah 1-2 jam pemberian sediaan (30). Dosis yang diberikan dirancang untuk

menyebabkan kematian hewan uji dari 0% hingga 100%. Kelipatan dosis dibuat tetap sesuai dengan ketentuan metode Thompson Weil. Maka dari itu, dipilih 4 tingkatan dosis sediaan uji yaitu 1000 mg/kgBB, 2000 mg/kgBB, 4000 mg/kgBB dan 8000 mg/kgBB.

Sediaan uji diberikan sekali pada hari ke-0 dan dilakukan pengamatan selama 24 jam pertama dengan 4 jam intensif. Bila tidak terjadi kematian, maka pengamatan dilanjutkan untuk melihat toksisitas tertundanya selama 14 hari. Pengamatan dilakukan terhadap gejala-gejala toksik yang timbul, dilakukan penimbangan berat badan setiap harinya dan dihari terakhir hewan dikorbankan dan diambil organ hati dan ginjal untuk diukur rasio masing-masing organ hewan tersebut.

4.4.1 Perhitungan LD50 dan penentuan status keamanan

Penelitian ini menguji beberapa tingkatan dosis pemberian fraksi ekstrak etanol daun sungkai kepada hewan uji sesuai dengan batas dosis yang telah dirancang. Pengujian toksisitas akut pada penelitian ini menggunakan dosis 1000, 2000, 4000 dan 8000 mg/kgBB, dimana sampai dosis 8000 mg/kgBB tidak ada hewan yang mati, untuk itu penentuan LD50 tidak dilanjutkan lagi karena hasil ini menunjukkan bahwa fraksi daun sungkai termasuk kategori tidak toksik karena mempunyai $LD50 > 8000$ mg/kgBB. Pada evaluasi toksisitas akut ini diamati dan diperiksa beberapa parameter ain : gejala toksik, persentase perubahan berat badan dan berat rasio organ.



4.4.2 Gejala Toksisitas

Hasil pengamatan yang dilakukan selama 14 hari terhadap gejala toksik berupa tremor, diare, salivasi, lemas, jalan mundur, jalan dengan perut, sesak napas dan piroleksi (12).

a. Fraksi n-heksan

Tabel 13. Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas Fraksi n-heksan

Gejala Toksisitas	K(-) NaCMC 0,5%	Dosis			
		1000 mg/kgBB	2000 mg/kgBB	4000 mg/kgBB	8000 mg/kgBB
Laju pernafasan	-	-	-	+	++
Lemas	-	-	-	+	++
Geliat	-	-	-	-	-
Piloereksi	-	-	-	-	-
Jalan dengan perut	-	-	-	+	+
Grooming	-	-	-	-	-
Tremor	-	-	-	-	-
Salivasi	-	-	-	+	+
Urinasi	-	-	-	+	+
Kematian	-	-	-	-	-

Keterangan:

- (-) = Tidak bergejala
- (+) = Bergejala ringan
- (++) = Bergejala sedang
- (+++)= Bergejala berat

Pada (Tabel 13) disajikan gejala toksik dari pemberian variasi dosis sediaan oral fraksi n-heksan ekstrak etanol daun sungkai. Berdasarkan tabel diketahui bahwa setelah pemberian fraksi n-heksan ekstrak etanol daun sungkai tidak

ditemukan adanya gejala toksik pada kelompok kontrol, perlakuan pada dosis 1000 dan 2000 mg/kgbb. Mencit bergerak aktif dan menunjukkan perilaku yang normal setelah pemberian sediaan uji. Gejala toksik mulai ditemukan pada dosis 4.000 mg/kgbb dan 8.000 mg/kgBB. Pada dosis 4000 mg/kgBB mencit bergerak pelan dan terjadi penurunan aktivitas motorik, lemas, sedikit salivasi dan sesak nafas. Namun gejala ini hanya berlangsung 1 jam pertama setelah pemberian sediaan uji, setelah itu mencit kembali bergerak aktif.. Gejala toksik bertambah pada dosis 8.000 mg/kgBB yaitu lemas, laju napas cepat, salivasi dan jalan sedikit merunduk. Terjadi penurunan aktifitas motorik pada mencit ditandai dengan pergerakan mencit yang melambat meskipun disentuh. Gejala-gejala toksisitas ini hanya berlangsung sekitar 1 jam pertama setelah pemberian sediaan uji, setelah itu hewan uji kembali dalam keadaan normal.

b. Fraksi Etil Asetat

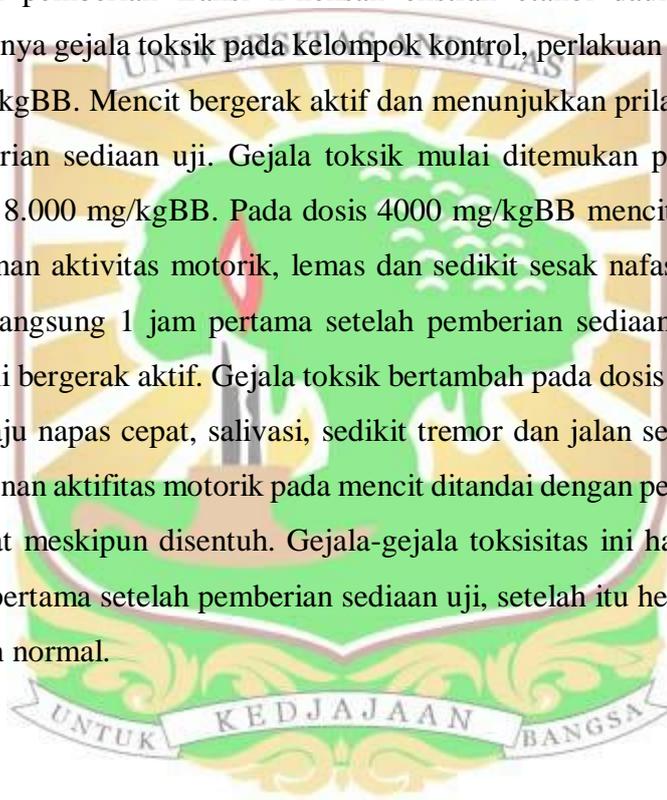
Tabel 14. Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas Fraksi Etil Asetat

Gejala Toksisitas	Dosis				
	K(-) NaCMC 0,5%	1000 mg/kgBB	2000 mg/kgBB	4000 mg/kgBB	8000 mg/kgBB
Laju pernafasan	-	-	-	+	++
Lemas	-	-	-	+	++
Geliat	-	-	-	-	-
Piloereksi	-	-	-	-	-
Jalan dengan perut	-	-	-	+	++
Grooming	-	-	-	-	-
Tremor	-	-	-	-	-
Salivasi	-	-	-	+	+
Urinasi	-	-	-	+	+
Kematian	-	-	-	-	-

Keterangan:

- (-) = Tidak bergejala
- (+) = Bergejala ringan
- (++) = Bergejala sedang
- (+++)= Bergejala berat

Pada (Tabel 14) disajikan gejala toksik dari pemberian variasi dosis sediaan oral fraksi etil asetat ekstrak etanol daun sungkai. Berdasarkan tabel diketahui bahwa setelah pemberian fraksi n-heksan ekstrak etanol daun sungkai tidak ditemukan adanya gejala toksik pada kelompok kontrol, perlakuan pada dosis 1000 dan 2000 mg/kgBB. Mencit bergerak aktif dan menunjukkan perilaku yang normal setelah pemberian sediaan uji. Gejala toksik mulai ditemukan pada dosis 4.000 mg/kgBB dan 8.000 mg/kgBB. Pada dosis 4000 mg/kgBB mencit bergerak pelan terjadi penurunan aktivitas motorik, lemas dan sedikit sesak nafas. Namun gejala ini hanya berlangsung 1 jam pertama setelah pemberian sediaan uji, setelah itu mencit kembali bergerak aktif. Gejala toksik bertambah pada dosis 8.000 mg/kgBB yaitu lemas, laju napas cepat, salivasi, sedikit tremor dan jalan sedikit merunduk. Terjadi penurunan aktifitas motorik pada mencit ditandai dengan pergerakan mencit yang melambat meskipun disentuh. Gejala-gejala toksisitas ini hanya berlangsung sekitar 1 jam pertama setelah pemberian sediaan uji, setelah itu hewan uji kembali dalam keadaan normal.



c. Fraksi Air

Tabel 15. Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas Fraksi Fraksi Air

Gejala Toksisitas	Dosis				
	K(-) NaCMC 0,5%	1000 mg/kgBB	2000 mg/kgBB	4000 mg/kgBB	8000 mg/kgBB
Laju pernafasan	-	-	-	+	++
Lemas	-	-	-	+	++
Geliat	-	-	-	-	-
Piloereksi	-	-	-	-	-
Jalan dengan perut	-	-	-	+	++
Grooming	-	-	-	-	-
Tremor	-	-	-	-	-
Salivasi	-	-	-	+	+
Urinasi	-	-	-	+	+
Kematian	-	-	-	-	-

Keterangan:

- (-) = Tidak bergejala
- (+) = Bergejala ringan
- (++) = Bergejala sedang
- (+++)= Bergejala berat

Pada (Tabel 15) diatas disajikan gejala toksik dari pemberian variasi dosis sediaan oral fraksi air ekstrak etanol daun sungkai . Berdasarkan tabel diketahui bahwa setelah pemberian fraksi n-heksan ekstrak etanol daun sungkai tidak ditemukan adanya gejala toksik pada kelompok kontrol, perlakuan pada dosis 1000 dan 2000 mg/kgBB. Mencit bergerak aktif dan menunjukkan perilaku yang normal setelah pemberian sediaan uji. Gejala toksik mulai ditemukan pada dosis 4.000 mg/kgBB dan 8.000 mg/kgBB. Pada dosis 4000 mg/kgBB mencit bergerak pelan, terjadi penurunan aktivitas motorik, sedikit lemas dan sesak nafas. Namun gejala

ini hanya berlangsung 1 jam pertama setelah pemberian sediaan uji, setelah itu mencit kembali bergerak aktif. Gejala toksik bertambah pada dosis 8.000 mg/kgBB yaitu lemas, laju napas cepat, sedikit salivasi, sedikit piroleksi dan jalan merunduk. Terjadi penurunan aktifitas motorik pada mencit ditandai dengan pergerakan mencit yang melambat meskipun disentuh. Gejala-gejala toksisitas ini hanya berlangsung sekitar 1-2 jam pertama setelah pemberian sediaan uji, setelah itu hewan uji kembali dalam keadaan normal.

Tabel 16. Kriteria penggolongan sediaan uji menurut OECD 420

Dosis (mg/kgBB)	Kematian	Kategori
5	≥ 2 dari 5 ekor mati	1
5	≥ 1 ekor menunjukkan gejala toksisitas dan tidak ada kematian	2
50	≥ 2 dari 5 ekor mati	
50	≥ 1 ekor dengan gejala toksisitas dan tidak ada kematian	3
300	≥ 2 dari 5 ekor mati	
300	≥ 1 ekor dengan gejala toksisitas dan atau < 1 mati	4
2000	≥ 2 dari 5 ekor mati	
2000	≥ 1 ekor dengan gejala toksisitas dan atau tidak ada kematian	5
	Tidak ada gejala toksisitas	

Evaluasi toksisitas akut tidak hanya mengenai LD50, tetapi juga terhadap kelainan tingkah laku, stimulasi, aktivitas motorik untuk mendapatkan gambaran tentang sebab kematian hewan uji. Data yang dikumpulkan dalam uji toksisitas akut

berupa tolok ukur ketoksikan kuantitatif yaitu kisaran dosis letal/toksik dan tolok ukur (35).

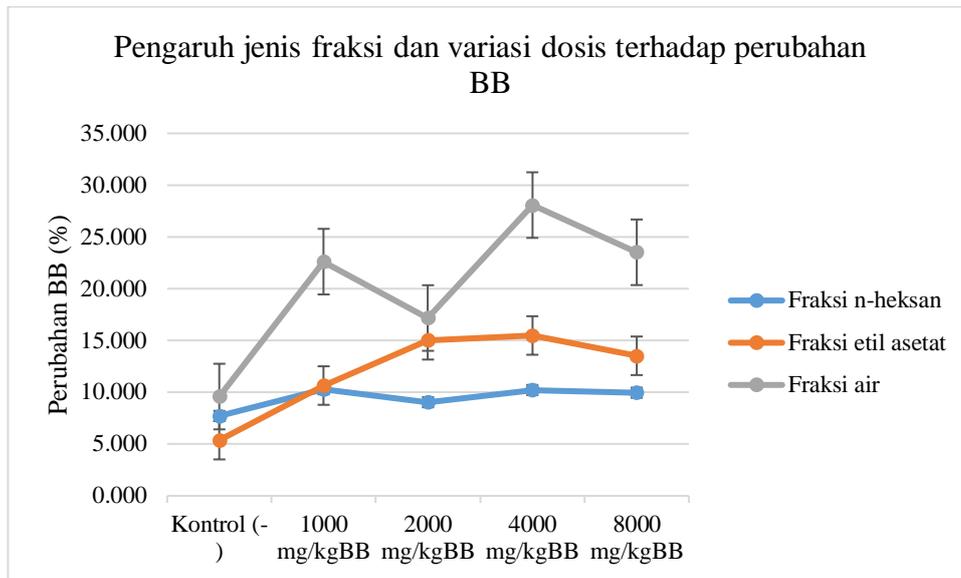
Berdasarkan (Tabel 16), kriteria penggolongan hewan uji menurut OECD yaitu masuk kategori *5/unclassified*, yang berarti pada sediaan oral fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air ekstrak etanol daun sungkai memiliki toksisitas akut yang relatif rendah (12).

4.4.3 Persentase perubahan berat badan

Berat badan ditimbang sebelum diberikan sediaan uji dan setelah diberikan sediaan uji selama 14 hari. Penimbangan berat badan dilakukan setiap hari dengan pemberian jumlah pakan yang sama pada setiap kelompoknya. Perubahan berat badan didapatkan dari rata-rata selisih berat badan dalam satu kelompok pada hari 1,2,3 dan seterusnya hingga hari ke 14 dikurangi berat badan sebelum diberi sediaan uji (hari ke-0). Data persentase perubahan berat badan selama 14 hari dianalisis menggunakan program SPSS (Statistical Product and Service Solution) dengan uji anova satu arah antara dosis dan % perubahan berat badan dan dilanjutkan dengan uji Duncan (52).

Tabel 17. Pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis terhadap perubahan berat badan mencit putih jantan

Kelompok Perlakuan	Perubahan BB (%) ± SE			Rata-rata (%) ± SE
	Fraksi n-heksan	Fraksi etil asetat	Fraksi air	
Kontrol (-)	7.7135 ± 1.980	5.3754 ± 1.980	9.5844 ± 1.980	7.558 ± 1.143
1000 mg/kgBB	10.2873 ± 1.980	10.6476 ± 1.980	22.6125 ± 2.054	14.516 ± 1.157
2000 mg/kgBB	9.0399 ± 1.980	15.0194 ± 1.980	17.1688 ± 2.138	13.743 ± 1.174
4000 mg/kgBB	10.2178 ± 1.980	15.4813 ± 1.980	28.0733 ± 2.233	17.924 ± 1.194
8000 mg/kgBB	9.9551 ± 1.980	13.5214 ± 1.980	23.5162 ± 2.469	15.664 ± 1.224
Rata-rata (%) ± SE	9.443 ± 0.885	12.009 ± 0.885	20.191 ± 0.976	



Gambar 5. Grafik pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis daun sungkai terhadap perubahan berat badan mencit putih jantan

Hasil dari analisis ANOVA dua arah menunjukkan terdapat pengaruh variasi dosis yang bermakna ($p < 0,05$) terhadap persentase perubahan berat badan mencit putih jantan, kemudian terlihat juga adanya interaksi antara variasi dosis dan jenis fraksi yang bermakna ($p < 0,05$) terhadap persentase perubahan berat badan mencit putih jantan (Lampiran 2, Tabel 43). Nilai rata-rata pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis daun sungkai terhadap persentase perubahan berat badan mencit putih jantan dapat dilihat pada Tabel 17 diatas.

Rata-rata persentase perubahan berat badan mencit yang diberikan fraksi daun sungkai lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif. Berdasarkan uji lanjutan Duncan terlihat adanya respon perbedaan yang nyata perubahan berat badan yang diberikan fraksi n-heksan, etil asetat dan air. Pada fraksi air terlihat peningkatan berat badan yang signifikan dibandingkan dua fraksi lainnya. Kemudian terlihat juga adanya respon perbedaan yang nyata perubahan berat badan yang diberikan variasi dosis, kelompok perlakuan memiliki persentase peningkatan berat badan yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif. Peningkatan berat badan tertinggi terlihat pada dosis 4000 mg/kgBB (Lampiran 2, Tabel 44, 45)

Berat badan ditentukan oleh keseimbangan antara masukan kalori dan pelepasan energi. Dengan cara tertentu berat badan dipertahankan pada titik tertentu. Nafsu makan diatur oleh hipotalamus melalui interaksi antara “pusat makanan” dan “pusat kenyang (54).

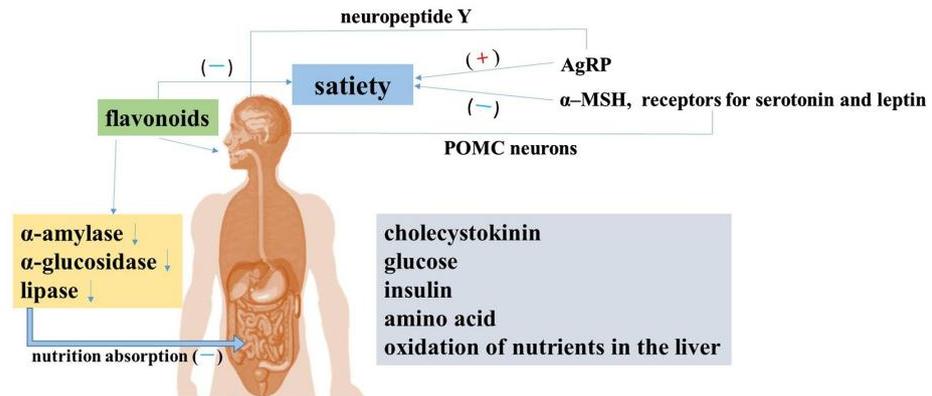


FIGURE 1 Flavonoids regulate food intake and nutrition absorption

Gambar 6. Mekanisme flavonoid dalam mengatur asupan makanan dan penyerapan nutrisi

Semua asam fenolik dan flavonoid yang diuji memiliki efek penghambatan pada enzim pencernaan termasuk α -amilase, α -glukosidase, dan lipase dalam derajat yang berbeda kecuali asam salisilat yang tidak menunjukkan penghambatan pada glukosidase. Flavanol serta flavon memiliki kapasitas penghambatan yang lebih tinggi pada α -amilase dan α -glukosidase (55)

α -amilase disekresikan oleh air liur dan pankreas, memainkan peran penting dalam penguraian karbohidrat kompleks menjadi molekul sederhana yang dapat diserap di saluran pencernaan. Efek penghambatan flavonoid pada α -amilase berkaitan dengan jumlah gugus hidroksil pada cincin B kerangka flavonoid, karena interaksi terjadi dengan pembentukan ikatan hidrogen antara gugus hidroksil pada flavonoid dan residu katalitik dari tempat terjadinya ikatan α -amilase (55).

Mengurangi aktivitas α -glukosidase dapat mencegah tubuh menyerap kelebihan glukosa, yang dapat mengontrol kadar glukosa darah, sehingga mengurangi absorpsi karbohidrat dan lemak yang menyebabkan terjadinya

penyumbatan enzim pencernaan yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat dan lipid dapat secara langsung mengurangi pencernaan dan penyerapannya. Ini telah terbukti menjadi cara tambahan untuk mencegah obesitas dan penurunan berat badan (55).

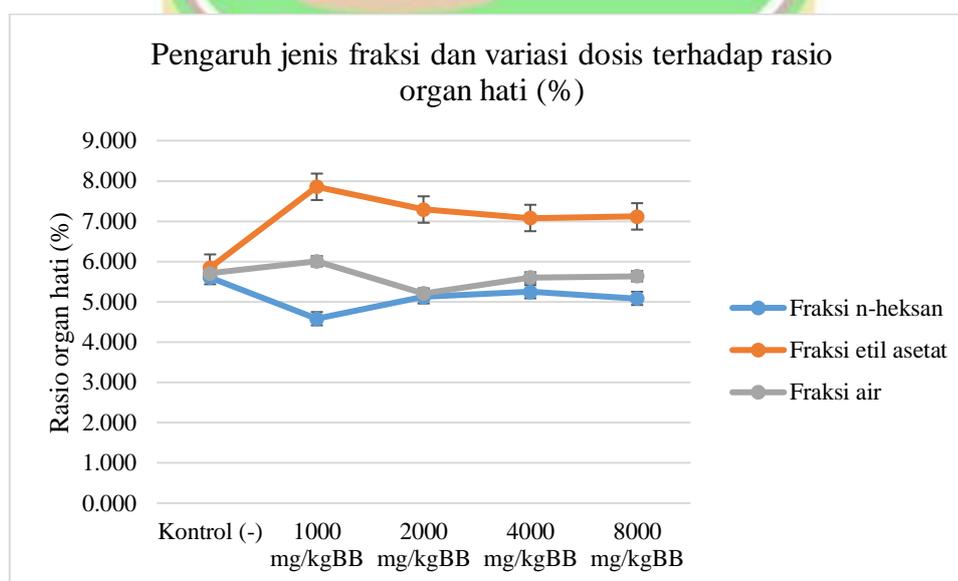
Flavonoid yang terakandung dalam fraksi daun sungkai diduga memiliki fungsi untuk memodulasi perilaku makan. Uji *in vivo* pada tikus menunjukkan adanya peningkatan ekspresi reseptor asam gamma-aminobutirat B1 (GABAB1R) dan menurunkan ekspresi neuropeptida Y (NPY) di hipotalamus, sehingga memodulasi perilaku asupan makanan/kontrol berat badan. Upregulasi GABABR1 diikuti oleh penurunan protein kinase A aktif (PKA) dan protein pengikat elemen cAMP-respon terfosforilasi (CREB), keduanya terletak di hilir GABAR1. Dengan cara yang sama, pemberian flavonoid pada tikus dapat menurunkan asupan makanan (56).

Diketahui pada dosis 4000 mg/kgBB fraksi etil asetat dan fraksi air daun sungkai terlihat terjadi peningkatan berat badan yang signifikan, hal ini terjadi diduga karena adanya senyawa yang belum diketahui pada fraksi etil asetat dan air daun sungkai, dimana senyawa ini mengaktifasi NPY dengan menurunkan kadar leptin, maka NPY yang disekresikan akan berikatan dengan reseptornya di neuron *proopiomelanocortin* (POMC) (reseptor Y1) dan menyebabkan inhibisi terhadap aktivitas neuron POMC tersebut. Aktivasi neuron yang mengekspresikan NPY dan *agouti related peptide* (AgRP) ini pada saat keseimbangan energi negatif, dapat menstimulasi makan dengan dua cara, yaitu dengan pelepasan perangsang nafsu makan NPY dan dengan menurunkan kerja penekan nafsu makan melanocortin/POMC (57).

4.4.4 Rasio organ hati

Tabel 18. Pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis terhadap rasio organ Hati mencit putih jantan

Kelompok Perlakuan	Rasio Organ Hati (%) \pm SE			Rata-rata (%) \pm SE
	Fraksi n-heksan	Fraksi etil asetat	Fraksi air	
Kontrol (-)	5.6000 \pm 0.221	5.8480 \pm 0.221	5.7042 \pm 0.221	5.717 \pm 0.128
1000 mg/kgBB	4.5800 \pm 0.221	7.8540 \pm 0.221	6.0052 \pm 0.221	6.146 \pm 0.128
2000 mg/kgBB	5.1220 \pm 0.221	7.2900 \pm 0.221	5.2048 \pm 0.247	5.872 \pm 0.133
4000 mg/kgBB	5.2500 \pm 0.221	7.0800 \pm 0.221	5.6042 \pm 0.221	5.978 \pm 0.128
8000 mg/kgBB	5.0840 \pm 0.221	7.1200 \pm 0.221	5.6347 \pm 0.286	5.946 \pm 0.141
Rata-rata (%) \pm SE	5.127 \pm 0.99	7.038 \pm 0.99	5.631 \pm 0.108	



Gambar 7. Grafik pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis daun sungkai terhadap rasio organ hati mencit putih jantan

Hasil dari analisis ANOVA dua arah menunjukkan tidak terdapat pengaruh variasi dosis yang bermakna ($p > 0,05$) terhadap persentase rasio organ hati mencit putih jantan, namun terlihat adanya interaksi antara variasi dosis dan jenis fraksi yang bermakna ($p < 0,05$) terhadap persentase rasio organ hati mencit putih jantan (Lampiran 2, Tabel 60)

Berdasarkan hasil uji Duncan, rata-rata persentase peningkatan rasio organ hati mencit putih jantan pada fraksi etil asetat lebih tinggi dibandingkan dengan dua fraksi lainnya. Namun dalam hal ini, tidak terdapat perbedaan respon yang bermakna antara variasi dosis dari tiap fraksi terhadap persentase rasio organ hati mencit putih jantan (Lampiran 2, Tabel 61, 62). Nilai rata-rata pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis daun sungkai terhadap persentase rasio organ hati mencit putih jantan dapat dilihat pada Tabel 18 diatas.

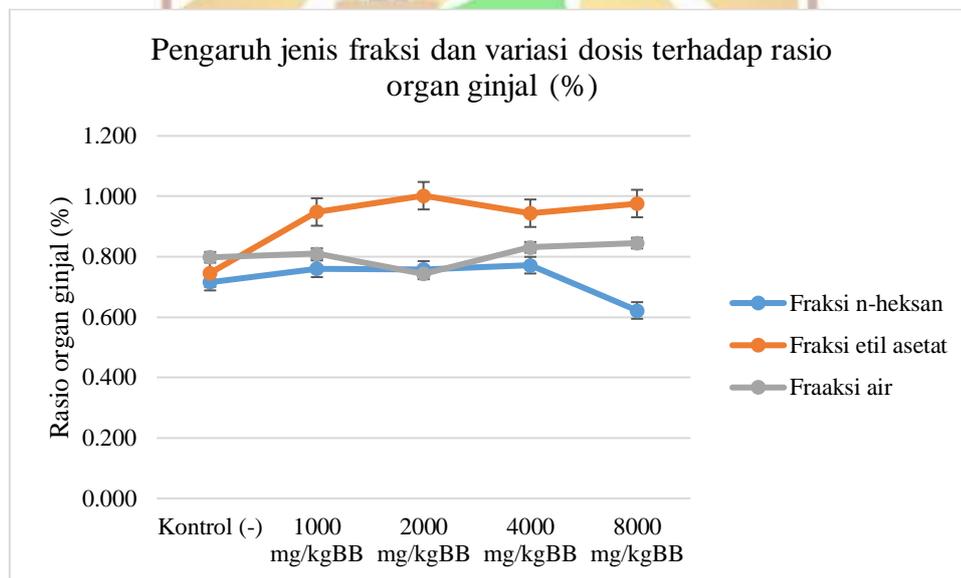
Hati merupakan organ yang memiliki kemampuan untuk pemulihan kerusakan sel yang sangat besar. Hati memiliki enzim sitokrom p-450 yang dapat memetabolisme zat asing di dalam tubuh, dengan membuat sebagian toksikan menjadi kurang toksik dan lebih mudah larut dalam air. Karena kita menggunakan rute oral maka senyawa uji akan mengalami siklus enterohepatik, setelah terjadi absorpsi pada saluran cerna, maka senyawa akan dibawa oleh vena porta menuju hati. Sekitar 80 % darah yang ada dalam hati berasal dari vena porta, sehingga hati sering menjadi organ sasaran senyawa toksik didalam tubuh (53).

Bobot hati hewan pengerat bervariasi menurut spesies dan strain tetapi biasanya berada dalam kisaran 2-3 g (3-5% berat badan, BB) pada mencit (58). Terlihat pada penelitian ini didapat persentase berat rasio organ hati 5-7% BB, sehingga dapat disimpulkan fraksi daun sungkai dengan variasi dosis dari 1000 – 8000 mg/kgBB tidak begitu mempengaruhi persentase berat rasio organ hati

4.4.5 Rasio Organ Ginjal

Tabel 19. Pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis terhadap rasio organ Hati mencit putih jantan

Kelompok Perlakuan	Rasio Organ Hati (%) \pm SE			Rata-rata (%) \pm SE
	Fraksi n-heksan	Fraksi etil asetat	Fraksi air	
Kontrol (-)	0.7160 \pm 0.039	0.7460 \pm 0.039	0.7980 \pm 0.039	0.753 \pm 0.22
1000 mg/kgBB	0.7600 \pm 0.039	0.9480 \pm 0.039	0.8100 \pm 0.050	0.839 \pm 0.25
2000 mg/kgBB	0.7580 \pm 0.039	1.0020 \pm 0.039	0.7433 \pm 0.050	0.834 \pm 0.25
4000 mg/kgBB	0.7720 \pm 0.039	0.9440 \pm 0.039	0.8310 \pm 0.039	0.849 \pm 0.22
8000 mg/kgBB	0.6220 \pm 0.039	0.9760 \pm 0.039	0.8454 \pm 0.039	0.814 \pm 0.22
Rata-rata (%) \pm SE	0.726 \pm 0.17	0.923 \pm 0.17	0.806 \pm 0.20	



Gambar 8. Grafik pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis daun sungkai terhadap rasio organ hati mencit putih jantan

Hasil dari analisis ANOVA dua arah menunjukkan adanya pengaruh variasi dosis yang bermakna ($p < 0,05$) terhadap persentase rasio organ ginjal mencit putih jantan, kemudian juga terlihat adanya interaksi antara variasi dosis dan jenis fraksi yang bermakna ($p < 0,05$) terhadap persentase rasio organ hati mencit putih jantan (Lampiran 2, Tabel 69)

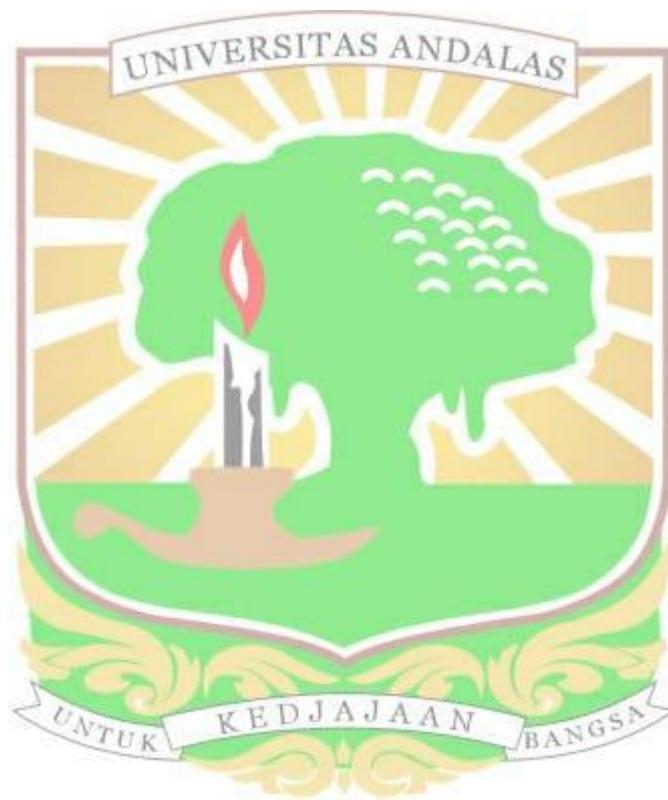
Berdasarkan hasil uji Duncan, rata-rata persentase peningkatan rasio organ ginjal mencit putih jantan pada fraksi etil asetat lebih tinggi dibandingkan dengan dua fraksi lainnya. Kemudian dalam hal ini, terdapat sedikit perbedaan respon yang bermakna antara variasi dosis dari tiap fraksi terhadap persentase rasio organ hati mencit putih jantan, terlihat pada uji Duncan pengaruh variasi dosis tiap fraksi terhadap rasio organ ginjal, dimana pada kelompok pemberian dosis memiliki nilai rasio organ ginjal sedikit lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif. (Lampiran 2, Tabel 61, 62). Nilai rata-rata pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis daun sungkai terhadap persentase rasio organ hati mencit putih jantan dapat dilihat pada Tabel 19 diatas.

Aliran darah yang besar menuju ginjal berfungsi menjaga homeostatik tubuh dengan cara mengatur keseimbangan elektrolit tubuh, mengatur keseimbangan asam basa dan mengatur osmolaritas tubuh. Ginjal mengekresikan zat terlarut dan membuang hasil metabolisme sehingga zat-zat yang kiranya tidak berguna bagi tubuh akan dibawa ke ginjal dalam jumlah yang besar. Ginjal merupakan organ yang vital bagi tubuh, oleh sebab itu sering dijadikan parameter pengamatan untuk uji toksisitas suatu obat (9).

Perubahan bobot organ dinilai sebagai indikator sensitif dari efek toksik yang ditimbulkan oleh jenis bahan atau senyawa baru yang diinduksikan pada hewan percobaan. Untuk mengetahui pengaruh senyawa yang diinduksikan ke hewan percobaan dan efeknya ke organ, bobot absolut dan bobot relatif digunakan sebagai indikator (59).

Rata-rata berat ginjal relatif (d disesuaikan dengan 30 gram) dari 21 galur tikus inbrida berkisar dari 0,6 g sampai 0,85 % BB, pada penelitian ini didapat berat organ ginjal berkisar antara 0,7-0,9 %. Rasio berat organ yang tidak normal terjadi pada fraksi etil asetat, dengan rentang persentase berat rasio organ 0,9-1,0 % BB mencit. Kemudian untuk fraksi n-heksan dan air dari daun sungkai dengan variasi

dosis dari 1000 – 8000 mg/kgBB tidak begitu mempengaruhi berat rasio organ ginjal dengan rata-rata persentase rasio organ 0,7-0,8 % BB mencit.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Pemberian dari masing-masing fraksi ekstrak etanol daun sungkai tidak memberikan efek toksik yang berbahaya bagi mencit, dibuktikan dengan kriteria golongan sediaan uji menurut OECD masuk kategori 5/*unclassified* dan juga nilai $LD_{50} > 8000 \text{ mg/kgBB}$
2. Pemberian fraksi dan variasi dosis dari daun sungkai berpengaruh terhadap persentase perubahan berat badan mencit putih jantan, peningkatan signifikan terjadi pada fraksi air dengan dosis 4000 mg/kgBB
3. Pemberian fraksi dan variasi dosis dari daun sungkai mempengaruhi persentase berat rasio organ hati dan ginjal, didapatkan peningkatan yang signifikan pada pemberian fraksi etil asetat daun sungkai. Rasio berat organ hati dan ginjal berturut-turut pada fraksi etil asetat daun sungkai adalah 7,038% dan 0,923% .;

5.2 Saran

1. Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk mencari nilai LD_{50} dan pemeriksaan lanjutan histopatologi pada organ hati dan ginjal mencit putih jantan.
2. Disarankan melakukan pengujian lebih lanjut kepada peneliti selanjutnya untuk dapat meneliti mengenai toksisitas sub akut, sub kronik dan uji toksisitas khusus lainnya dari masing-masing fraksi daun sungkai

DAFTAR PUSTAKA

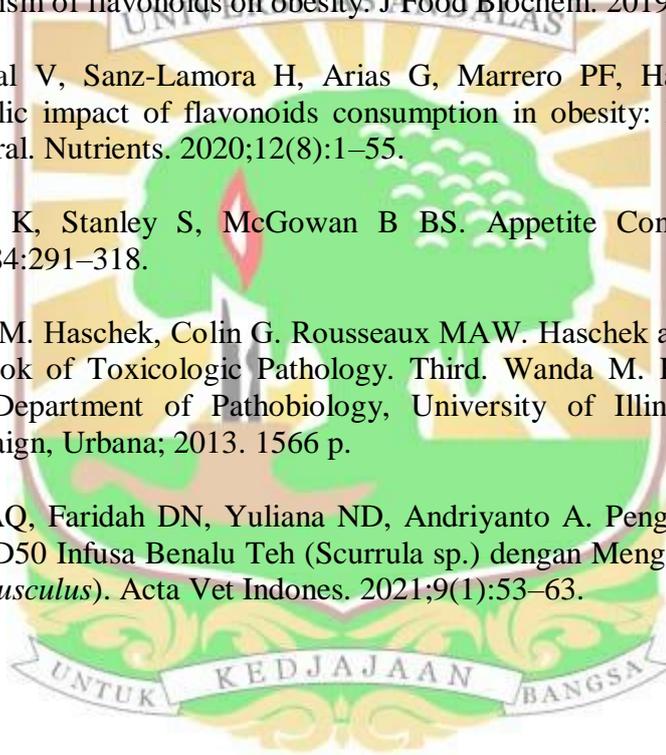
1. Yani A.P; Putranto A.M.H. Examination of the Sungkai's Young Leaf Extract (*Peronema canescens*) as an Antipiretic, Immunity, Antiplasmodium and Teratogeny in Mice (*Mus.muculus*). Int J Sci Eng. 2014;7(1):30–4.
2. Mustapa, Moh A; uloli, Tety S; Mooduto AM. Uji Toksisitas Akut Yang Diukur Dengan Penentuan Ld50 Ekstrak Etanol Bunga Cengkeh (*Syzygium Aromaticum* L.) Terhadap Mencit (*Mus Musculus*) Menggunakan Metode Thompson-Weil. Front J Sains Dan Teknol. 2018;1.
3. Shakya A, Chaudhary SK, Bhat HR, Ghosh SK. Acute and sub-chronic toxicity studies of Benincasa hispida (Thunb.) cogniaux fruit extract in rodents. Regul Toxicol Pharmacol. 2020;118(July):104785.
4. Neli Peni P, Daniel, Chairul S, Rahayu A, Magdaleni. Uji Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Fraksi N-heksana, Etil Asetat dan Etanol Sisa dari Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack.) dengan Metode DPPH. J At. 2021;22–7.
5. Yunita Fenny. Peranan Bahan Alam dalam Pandemi Covid-19. Ebers Papyrus . 2021;27(1):4–15.
6. Yani AP, Aceng Ruyani, Ansyori I, Irwanto R. The Potential Test of Sungkai Young Leaves (*Peronema canescens*) to Maintain Goodhelth (Immunity) in Mice (*Mus musculus*) Seminar Nasional XI Pendidikan Biologi FKIP UNS Biologi , Sains , Lingkungan , dan Pembelajarannya . 2013;245–50.
7. Yani AP. Kearifan Lokal Penggunaan Tumbuhan Obat Oleh Suku. Pros Semirata FMIPA Univ Lampung. 2013;12(Supriadi 2001):71–4.
8. Muñoz MNM, Alvarado UG, Reyes JIL, Watanabe K. Acute oral toxicity assessment of ethanolic extracts of *Antidesma bunius* (L.) Spreng fruits in mice. Toxicol Reports. 2021;8(October 2020):1289–99.
9. Wahyuni FS, Putri IN, Arisanti D. Uji Toksisitas Subkronis Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Asam Kandis (*Garcinia cowa* Roxb.) terhadap Fungsi Hati dan Ginjal Mencit Putih Betina. J Sains Farm Klin. 2017;3(2):202.
10. BPOM. Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis Secara In Vivo. Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indones. 2014;66–8.
11. Teke GN, Kuete V. Acute and Subacute Toxicities of African Medicinal Plants [Internet]. Toxicological Survey of African Medicinal Plants. Elsevier Inc.; 2014. 63–98.

12. OECD TG420. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. OECD Guidel Test Chem. 2001;(December):1–14.
13. Rahayu, M; Solihat M. Toksikologi Klinik. In: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2018. p. 447.
14. Eva M. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Terhadap Fungsi Ginjal Mencit Putih Betina (*Mus musculus* Linn.). Univ Jambi. 2021;
15. Badrunasar, A; Nurahmah Y. Pertelaan Jenis Pohon Koleksi Arboretum. In: Balai Penelitian Teknologi Agroforestry. 2012. p. 542.
16. Panjaitan S, Yeni N. Prospek dan Teknik Budidaya Sungkai (*Peronema canescens* Jack.) di Kalimantan Selatan. J Galam. 2014;7(1):25–30.
17. Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri. Situasi Ketahanan Pangan di Masa Pandemi. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 2020;26(3):1–32.
18. Ningsih A, Djide, Subehan, Natsir M. Antimicrobial Potency and Spectroscopy Analysis of Active Isolate of Sungkai Leave Extract n-hexane (*Peronema canescens* . Jack) on Some Test Microbial. Fak Farm Univ Hasanuddin. 2013;
19. Kitagawa, I; Simanjuntak, P; Hori, K; Nagami, N; Mahmud, T; Shibuya, H; Kobayashi M. Indonesian Medicinal Plants. VII.1 Seven New Clerodane-Type Diterpenoids, Peronemins A2, A3, B1, B2, B3, C1, and D1, from the Leaves of *Peronema canescens* (Verbenaceae). Chem Pharm Bull. 1994;42(5):6.
20. Fransisca D, Kahanjak DN, Frethernety A. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dengan metode difusi cakram Kirby-Bauer. J Pengelolaan Lingkungan Berkelanjutan (Journal Environ Sustain Manag. 2020;4(1):460–70.
21. Depkes RI. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat, Jakarta: Departement Kesehatan Republik Indonesia. Dep Kesehat RI. 2000;112.
22. Hanani E. Analisis Fitokimia. Jakarta: EGC; 2015. 262 p
23. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. Chinese Med (United Kingdom).
24. Fonmboh DJ, Abah ER, Fokunang TE, Herve B, Teke GN, Rose NM, et al. An Overview of Methods of Extraction, Isolation and Characterization of Natural Medicinal Plant Products in Improved Traditional Medicine Research. Asian J Res Med Pharm Sci. 2020;(January 2021):31–57.

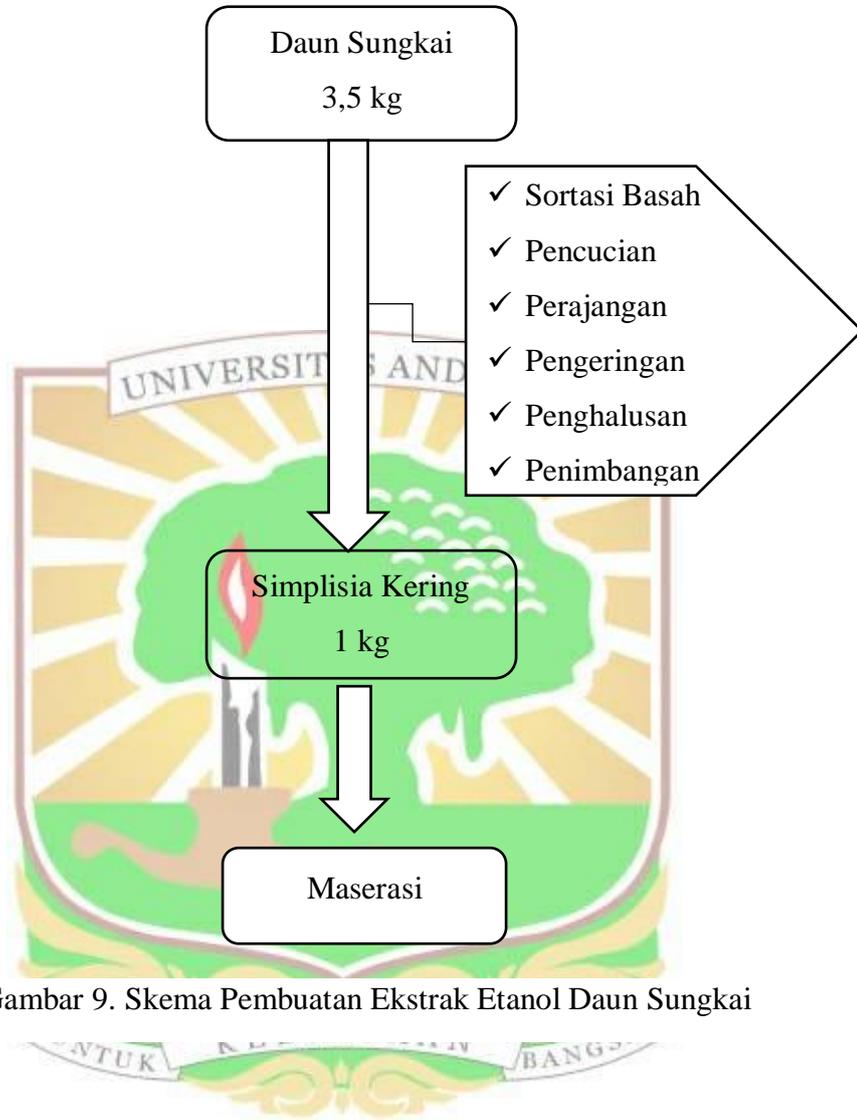
25. Gaidhani K., Harwalkar M, Bhambere D, Mitra R, Nirgude P. Lyophilization / Freeze Drying – A Review. *World J Pharm Res.* 2015;4(8):29.
26. Afokwah, A.N; Adomako, C; Engman, N.F; Hannah A. Spray Drying as an Appropriate Technology for the Food and Pharmaceutical Industries - A Review. *J Environ Sci , Comput Sci Eng Technol Biol Denitrification – A Rev.* 2014;1(3):9–27.
27. Sari IRM. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jamur *Pleurotus Ostreatus* dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif. Skripsi UI Jakarta. 2012;9.
28. RSPCA. The use of animals in toxicity testing: An RSPCA information paper. *Res Anim Dep.* 2010;10.
29. Lu F. Toksikologi Dasar: Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Resiko. Vol. 2, Universitas Indonesia Press. 1995. 429 p.
30. BPOM RI. Peraturan Badan Pengawas Obat Dan Makanan Tentang Pedoman Uji Toksisitas Praklinik Secara *in Vivo*. *J Chem Inf Model.* 2020;53(9):21–5.
31. Arome D, Chinedu E. The importance of toxicity testing. *J Pharm Biosci.* 2014;4(2013):146–8.
32. Denny KH, Stewart CW. Acute, Subacute, Subchronic, and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development. Second Edi. A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development. Elsevier Inc.; 2017. 109–127 p.
33. Parasuraman S. Toxicological screening. *J Pharmacol Pharmacother.* 2011;2(2):74–9.
34. Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). The Organization of Economic Co-operation and Development Guidelines Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. *Oecd.* 2002;(December):1–14.
35. Putri DE. Uji Toksisitas Akut yang Diukur dengan Penentuan LD50 Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) pada Mencit Jantan. *Farmasi.* 2018;2:44–8.
36. Olfert E, Cross B, Mc William A. Guide to the Care and Use of Experimental Animals Volume 1 , 2 nd Edition. Vol. 1. 2020.
37. Upa FT, Saroyo S, Katili DY. Komposisi Pakan Tikus Ekor Putih (*Maxomys hellwandii*) di Kandang. *J Ilm Sains.* 2017;17(1):7.

38. Supriyono. Pengujian Lethal Dosis (LD50) Ekstrak Etanol Biji Buah Duku (*Lansium domesticum* corr) pada Mencit (*Mus musculus*). 2007;10–2.
39. Depkes RI. Farmakope Herbal Indonesia. Edisi II. Departemen Kesehatan RI. Jakarta: Depkes RI; 2017. 529 p.
40. Fauzi NP, Sulistiyaningsih, Runadi D. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun jawer kotok (*Coleus atropurpureus* (L) Benth.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* ATTC 1223 dan *Staphylococcus epidermidis* ATTC 12228. Farmaka. 2017;15(3):45–55.
41. Shrestha P, Adhikari S, Lamichhane B, Shrestha BG. Phytochemical Screening of Selected Medicinal Plants of the Family Lythraceae. IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol. 2015;1(6):11–7.
42. Vogel, W; Scholkens, B. A; Sandow J. Drug Discovery and Evaluation. Vol. 17, Human & Experimental Toxicology. 1998. 591–591 p.
43. Fitriatul W. Aktivitas Ekstrak Terstandar Dari Pegagan Embun (*Hydrocotyle sibthorpioides* Lam.) Terhadap Aktivitas Sel NK, Sel CD8 dan Sel Leukosit Mencit Putih Jantan Terpapar Antigen Virus H5N1. Universitas Andalas. 2021;
44. Hazarika I, Geetha KM, Sundari PS, Madhu D. Acute oral toxicity evaluation of extracts of *Hydrocotyle sibthorpioides* in wister albino rats as per OECD 425 TG. Toxicol Reports. 2019;6(March):321–8.
45. Ellyn Dasrinal. Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) dan Uji Aktivitas Imunomodulator. Universitas Jambi; 2022.
46. Handayani S, Wirasutisna KR, Insanu M. Penapisan Fitokimia Dan Karakterisasi Simplisia Daun Jambu Mawar. 2017;5(3):10.
47. Saragih DE, Arsita EV. Kandungan fitokimia *Zanthoxylum acanthopodium* dan potensinya sebagai tanaman obat di wilayah Toba Samosir dan Tapanuli Utara, Sumatera Utara. Pros Semin Nas Masy Biodiversitas Indones. 2019;5(1):71–6.
48. Mukhriani. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif. J Kesehat. 2014;Volume VII.
49. Dr.rer.nat. I Made Agus Gelgel Wirasuta, M.Si., Apt. Rasmaya Niruri, S.Si.. Toksikologi umum. 2006;
50. Emmanuel B Thompson. Drug bioscreening : drug evaluation techniques in pharmacology. Print book. New York: VCH; 1990.

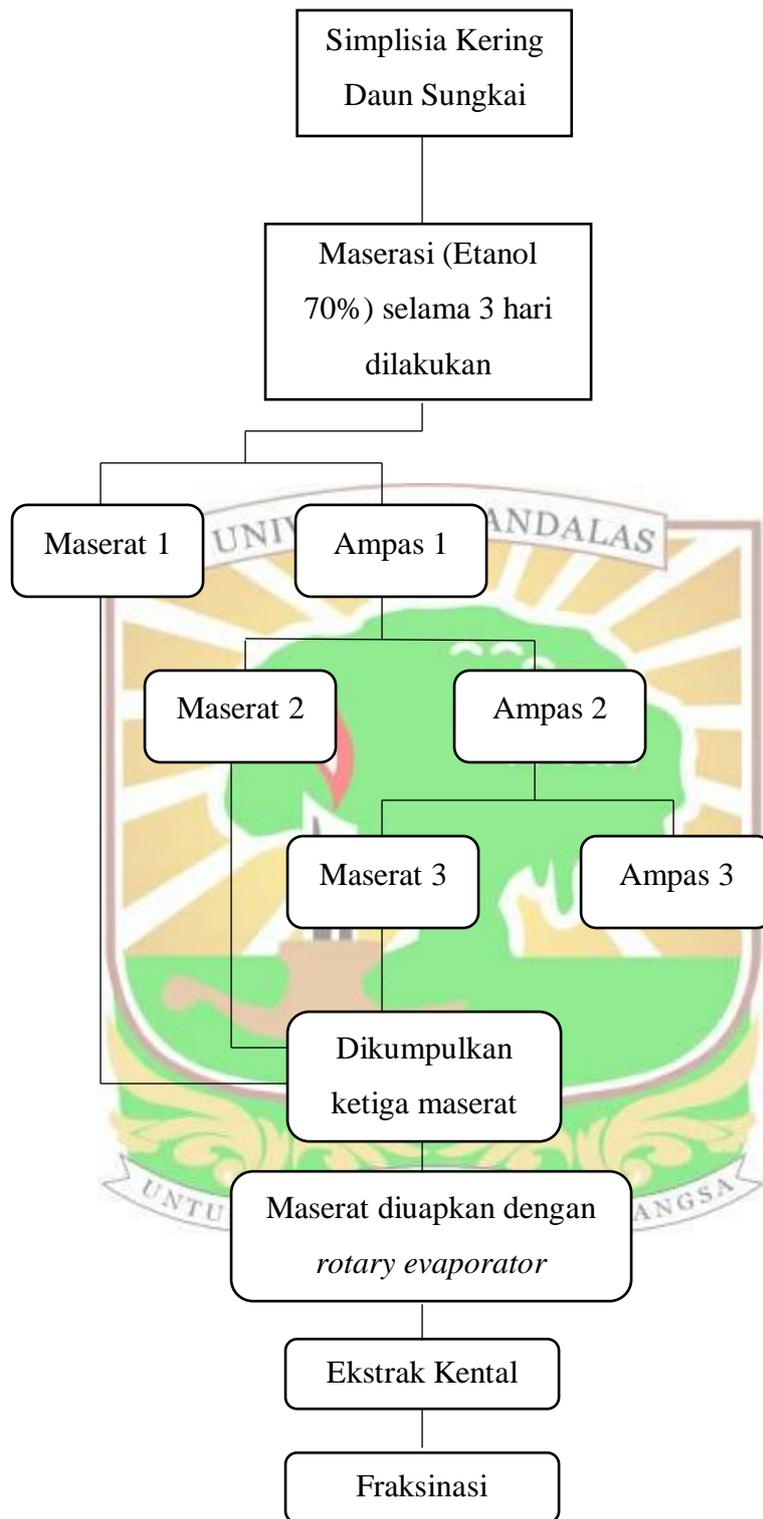
51. Rowe RC SPQ. Handbook of Pharmaceutical Excipients (6th ed). 6th ed. USA: Pharmaceutical Press; 2009. 855 p.
52. Rutam E et al. Penentuan LD-50 dan Kajian Toksisitas Tertunda Ekstrak Etanol Daun *Nothopanax scutellarium* Merr. Vol. 1, Jurnal Medika Planta. 2011. p. 75–82.
53. Oktavia S, Ifora, Putri AD. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus* L.). J Farm Higea. 2018;10(1):41–8.
54. Guyton, Arthur C. JEH. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. 9th ed. Jakarta: EGC; 1997.
55. Song D, Cheng L, Zhang X, Wu Z, Zheng X. The modulatory effect and the mechanism of flavonoids on obesity. J Food Biochem. 2019;43(8):1–13.
56. Sandoval V, Sanz-Lamora H, Arias G, Marrero PF, Haro D, Relat J. Metabolic impact of flavonoids consumption in obesity: From central to peripheral. Nutrients. 2020;12(8):1–55.
57. Wynne K, Stanley S, McGowan B BS. Appetite Control. J Endocr. 2005;184:291–318.
58. Wanda M. Haschek, Colin G. Rousseaux MAW. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Third. Wanda M. Haschek, editor. USA: Department of Pathobiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana; 2013. 1566 p.
59. Ayun AQ, Faridah DN, Yuliana ND, Andriyanto A. Pengujian Toksisitas Akut LD50 Infusa Benalu Teh (*Scurrula* sp.) dengan Menggunakan Mencit (*Mus musculus*). Acta Vet Indones. 2021;9(1):53–63.



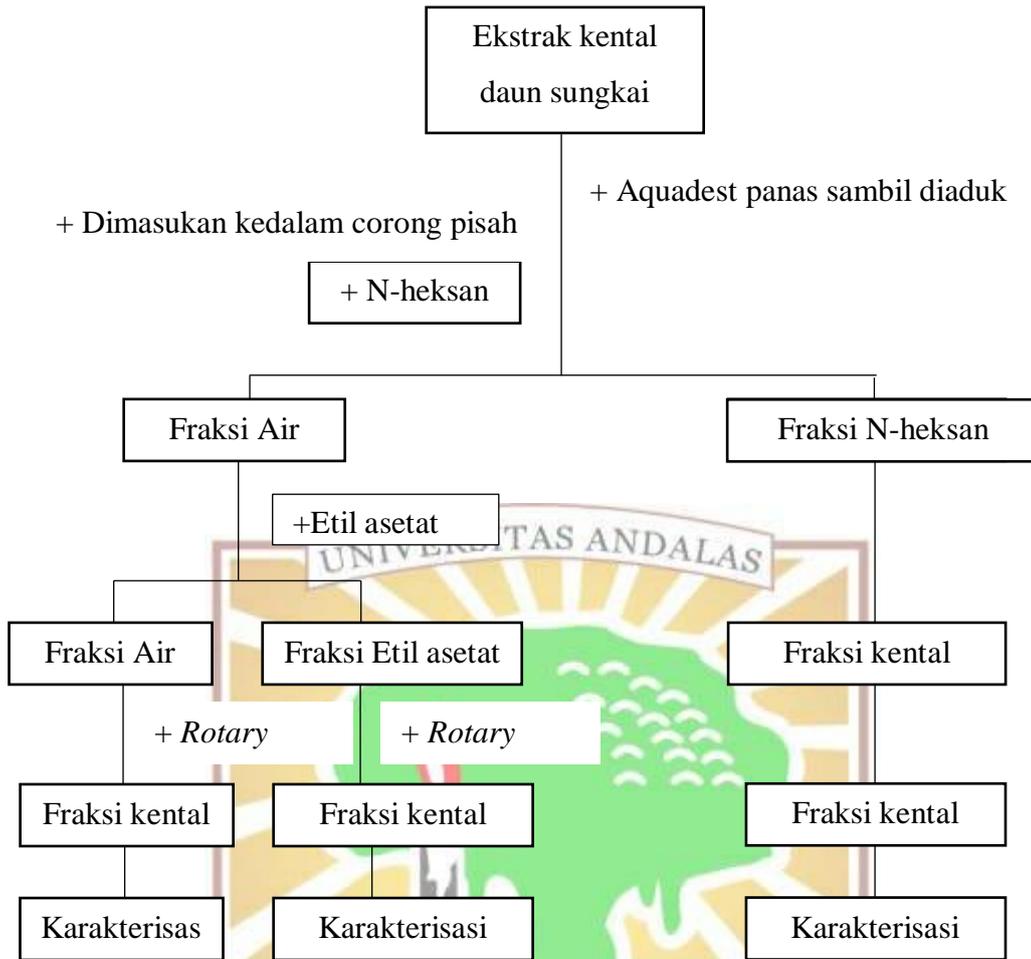
Lampiran 1. Skema Kerja



Gambar 9. Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sungkai

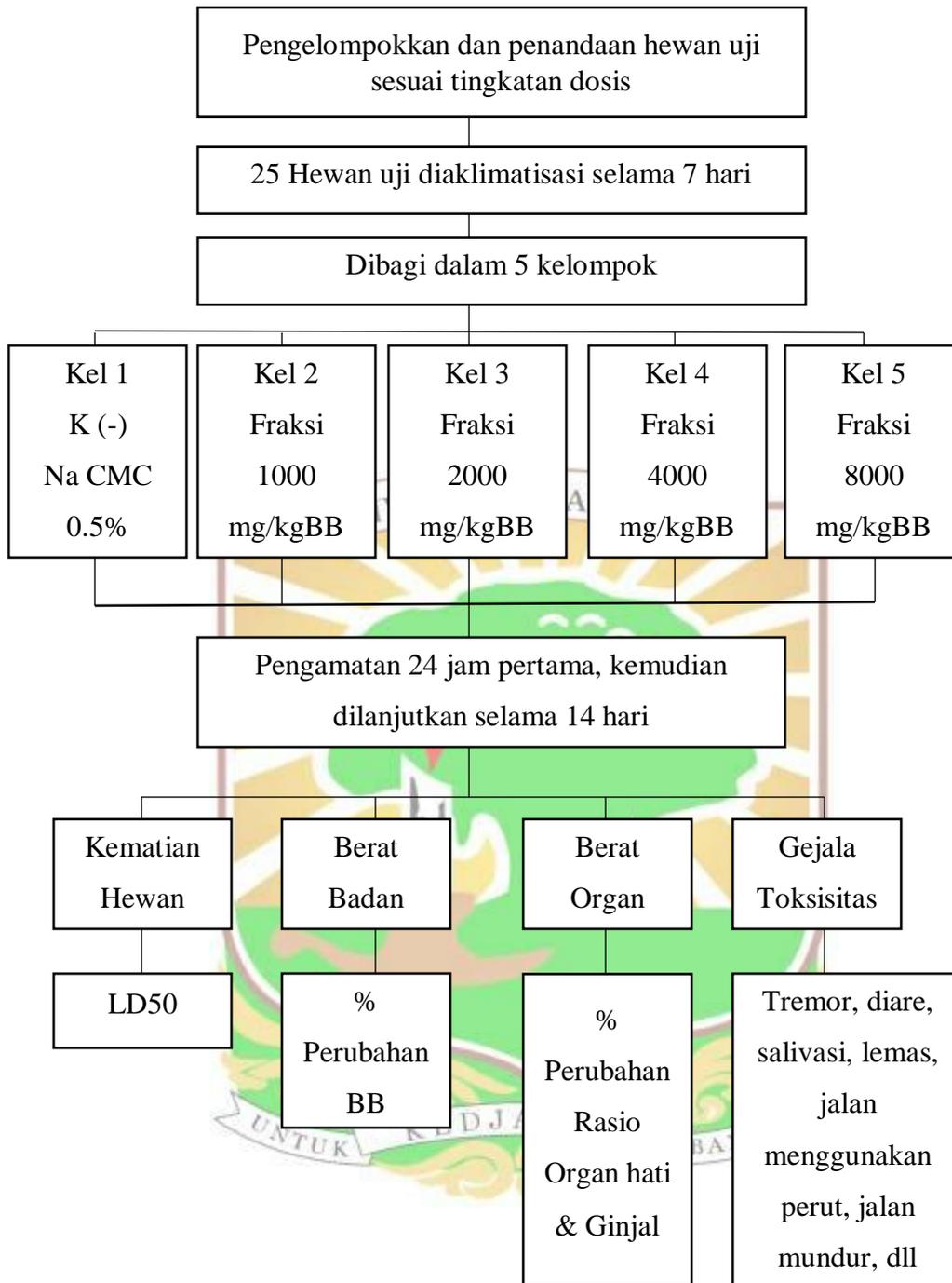


Gambar 10. Lanjutan Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sungkai



Gambar 11. Skema Pembuatan Fraksi Daun Sungkai





Gambar 12. Skema Penentuan Toksisitas Akut dan LD50

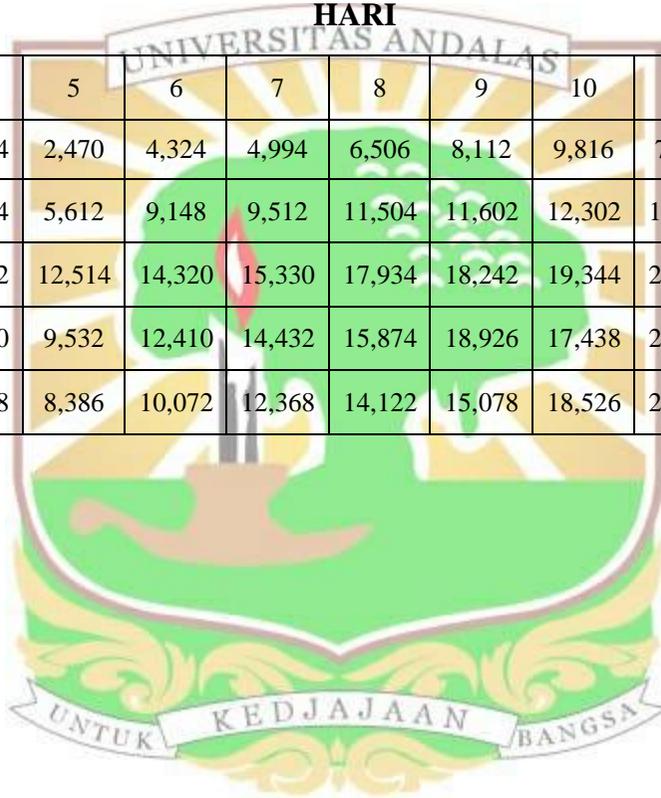
Lampiran 2. Data Penelitian

Tabel 20. Data persentase perubahan BB fraksi n-heksan

KELOMPO K	HARI														RATA- RATA±SE
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Kontrol (-)	2,882	2,925	3,31	5,43 3	7,310	7,39 3	7,545	9,736	9,861	10,87 2	11,34 1	11,35 0	9,225	8,421	7,713±0,818
Dosis 1000 mg/kgBB	2,212	4,442	7,595	9,73 3	7,947	7,60 5	10,36 5	12,77 8	11,66 3	15,38 7	16,00 3	12,19 7	12,41 5	13,68 0	10,287±1,06 4
Dosis 2000 mg/kgBB	5,864	7,712	10,268	8,83 8	7,256	9,24 0	8,127	8,678	10,34 8	12,21 0	11,05 0	8,998	9,150	9,275	9,039±0,431
Dosis 4000 mg/kgBB	5,458	3,997	8,788	7,23 2	8,322	9,37 8	8,688	11,53 5	11,12 3	13,87 7	13,63 8	14,11 8	13,67 3	13,22 2	10,217±0,88 5
Dosis 8000 mg/kgBB	7,446	6,743	7,946	8,82 0	10,31 3	9,88 5	10,51 8	11,18 3	10,96 5	12,40 7	12,33 0	10,47 5	9,922	10,41 8	9,955±0,451

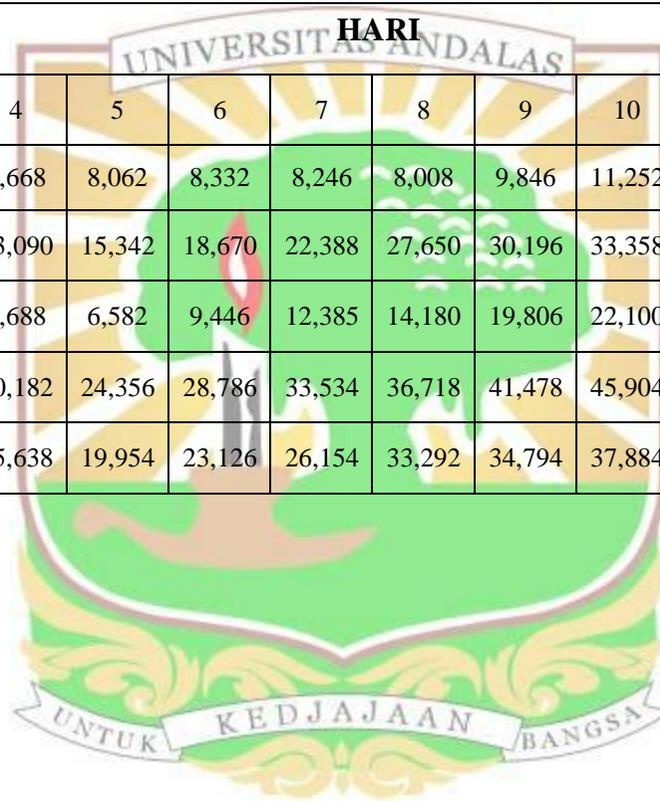
Tabel 21. Data persentase perubahan BB fraksi etil asetat

KELOMPOK	HARI														RATA-RATA±SE
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Kontrol (-)	0,232	0,466	1,826	1,004	2,470	4,324	4,994	6,506	8,112	9,816	7,882	8,774	8,996	9,814	5,375±0.968
Dosis 1000 mg/kgBB	1,842	2,894	4,162	4,904	5,612	9,148	9,512	11,504	11,602	12,302	17,152	17,536	19,832	21,064	10,647±1.704
Dosis 2000 mg/kgBB	3,000	6,054	8,966	9,282	12,514	14,320	15,330	17,934	18,242	19,344	20,692	20,698	21,896	22,000	15,019±1.656
Dosis 4000 mg/kgBB	3,632	2,294	4,782	8,410	9,532	12,410	14,432	15,874	18,926	17,438	24,458	24,310	29,354	30,886	15,481±2.490
Dosis 8000 mg/kgBB	2,578	3,354	5,570	5,648	8,386	10,072	12,368	14,122	15,078	18,526	21,306	22,790	25,456	24,046	13.521±2.116



Tabel 22. Data persentase perubahan BB fraksi air

KELOMPOK	HARI														RATA-RATA±SE
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Kontrol (-)	5,672	6,996	6,602	6,668	8,062	8,332	8,246	8,008	9,846	11,252	11,598	13,232	14,402	15,276	9,584±0,823
Dosis 1000 mg/kgBB	1,000	3,268	9,668	13,090	15,342	18,670	22,388	27,650	30,196	33,358	36,722	40,240	42,370	45,084	24,217±3,876
Dosis 2000 mg/kgBB	1,000	2,780	6,062	5,688	6,582	9,446	12,385	14,180	19,806	22,100	24,028	26,046	28,494	31,208	14,986±2,716
Dosis 4000 mg/kgBB	3,012	10,300	15,572	20,182	24,356	28,786	33,534	36,718	41,478	45,904	48,964	53,614	57,442	61,652	34,393±4,859
Dosis 8000 mg/kgBB	3,260	8,334	12,470	15,638	19,954	23,126	26,154	33,292	34,794	37,884	41,456	44,832	47,448	49,490	28,438±4,031



Tabel 23. Persentase berat rasio organ hati fraksi n-heksan

KELOMPOK	RASIO ORGA HATI					RATA-RATA±SE
Kontrol (-)	5,360	5,970	5,642	4,780	6,257	5,600±0,254
Dosis 1000 mg/kgBB	4,850	3,400	4,490	5,324	4,846	4,580±0,323
Dosis 2000 mg/kgBB	4,470	5,443	4,714	5,550	5,440	5,122±0,221
Dosis 4000 mg/kgBB	5,990	5,942	4,760	4,654	4,914	5,250±0,294
Dosis 8000 mg/kgBB	4,780	4,890	5,273	5,400	5,082	5,084±0,115

Tabel 24. Persentase berat rasio organ hati fraksi etil asetat

KELOMPOK	RASIO ORGA HATI					RATA-RATA±SE
Kontrol (-)	5,230	5,270	6,400	6,592	5,750	5,840±0,281
Dosis 1000 mg/kgBB	7,185	7,500	8,785	8,040	7,773	7,854±0,271
Dosis 2000 mg/kgBB	8,000	7,513	6,924	6,944	7,080	7,290±0,206
Dosis 4000 mg/kgBB	7,394	7,020	7,393	6,867	6,746	7,080±0,134
Dosis 8000 mg/kgBB	6,346	6,663	7,914	7,563	7,137	7,120±0,286

Tabel 25. Persentase berat rasio organ hati fraksi air

KELOMPOK	RASIO ORGAN HATI					RATA-RATA±SE
Kontrol (-)	5.340	5.712	5.363	5.723	6.390	5,704±0,189
Dosis 1000 mg/kgBB	6.203	5.990	5.727	6.390	5.723	6,005±0,132
Dosis 2000 mg/kgBB	5.294	5.175	4.921	5.030	5.325	5,146±0,076
Dosis 4000 mg/kgBB	5.390	5.553	5.990	5.953	5.142	5,604±0,164
Dosis 8000 mg/kgBB	5.553	5.980	5.762	5.602	5.280	5,633±0,115

Tabel 26. Persentase berat rasio organ ginjal fraksi n-heksan

KELOMPOK	RASIO ORGAN GINJAL					RATA-RATA±SE
Kontrol (-)	0,69	0,74	0,73	0,74	0,68	0,716±0,012
Dosis 1000 mg/kgBB	0,74	0,78	0,71	0,96	0,61	0,760±0,057
Dosis 2000 mg/kgBB	0,75	0,80	0,66	0,78	0,80	0,758±0,026
Dosis 4000 mg/kgBB	0,79	0,67	0,79	0,73	0,88	0,772±0,034
Dosis 8000 mg/kgBB	0,59	0,62	0,63	0,63	0,64	0,622±0,008

Tabel 27. Persentase berat rasio organ ginjal fraksi etil asetat

KELOMPOK	RASIO ORGAN GINJAL					RATA-RATA±SE
Kontrol (-)	0.670	0.650	0.750	0.850	0.810	0,746±0,038
Dosis 1000 mg/kgBB	0.900	0.873	1.092	0.891	0.990	0,948±0,041
Dosis 2000 mg/kgBB	0.892	0.930	0.930	0.940	1.322	0,928±0,010
Dosis 4000 mg/kgBB	1.061	0.732	1.010	0.942	0.980	0,944±0,056
Dosis 8000 mg/kgBB	1.110	1.020	0.864	0.860	1.032	0,976±0,049

Tabel 28. Persentase berat rasio organ ginjal fraksi air

KELOMPOK	RASIO ORGAN GINJAL					RATA-RATA±SE
Kontrol Negatif	0.760	0.830	0.810	0.790	0.800	0,798±0,011
Dosis 1000 mg/kgBB	0.802	0.670	0.620	0.830	0.800	0,744±0,041
Dosis 2000 mg/kgBB	1.000	0.720	0.730	0.780	0.682	0,720±0,017
Dosis 4000 mg/kgBB	0.823	0.850	0.830	0.834	0.820	0,831±0,005
Dosis 8000 mg/kgBB	0.830	0.830	0.840	0.862	0.851	0,845±0,007

Lampiran 3. Hasil Perhitungan Statistik

Tabel 29. Hasil uji normalitas data berdasarkan jenis fraksi dan variasi dosis dari daun sungkai terhadap mencit putih jantan

Tests of Normality							
	Jenis Fraksi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual	Fraksi n-heksan	.081	70	.200*	.984	70	.491
	Fraksi etil asetat	.068	70	.200*	.978	70	.263
	Fraksi air	.110	59	.072	.948	59	.014

Tests of Normality							
	Variasi Dosis	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual	Kontrol (-)	.121	42	.126	.946	42	.048
	1000 mg/kgBB	.084	41	.200*	.978	41	.612
	2000 mg/kgBB	.137	40	.057	.961	40	.176
	4000 mg/kgBB	.175	39	.004	.960	39	.181
	8000 mg/kgBB	.117	37	.200*	.966	37	.313

Tabel 30. Hasil uji homogenitas data berdasarkan jenis fraksi dan variasi dosis dari daun sungkai terhadap mencit putih jantan

Levene's Test of Equality of Error Variances ^{a,b}					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Perubahan BB	Based on Mean	11.437	14	184	.063
	Based on Median	10.881	14	184	.047
	Based on Median and with adjusted df	10.881	14	81.120	.052
	Based on trimmed mean	11.379	14	184	.034

Tabel 31. Hasil Uji ANOVA dua arah pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis terhadap perubahan berat badan mencit putih jantan

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Perubahan BB					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7033.976 ^a	14	502.427	9.158	.000
Intercept	37764.243	1	37764.243	688.338	.000
Jenis_Fraksi	3888.544	2	1944.272	35.439	.000
Variasi_Dosis	2435.091	4	608.773	11.096	.000
Jenis_Fraksi * Variasi_Dosis	1243.423	8	155.428	2.833	.005
Error	10094.781	184	54.863		
Total	52584.168	199			
Corrected Total	17128.756	198			

Tabel 32. Hasil uji Duncan pengaruh jenis fraksi terhadap persentase perubahan berat badan mencit putih jantan

Perubahan BB				
Duncan ^{a,b,c}				
Jenis Fraksi	N	Subset		
		1	2	3
Fraksi n-heksan	70	9.4427		
Fraksi etil asetat	70		12.0090	
Fraksi air	59			19.5698
Sig.		1.000	1.000	1.000

Tabel 33. Hasil uji Duncan pengaruh variasi dosis terhadap persentase perubahan berat badan mencit putih jantan

Perubahan BB				
Duncan ^{a,b,c}				
Variasi Dosis	N	Subset		
		1	2	3
Kontrol (-)	42	7.5578		
2000 mg/kgBB	40		13.5714	
1000 mg/kgBB	41		14.3183	14.3183
8000 mg/kgBB	37		14.6032	14.6032
4000 mg/kgBB	39			17.1434
Sig.		1.000	.563	.110

Tabel 34. Hasil uji normlitas data berdasarkan jenis fraksi dan variasi dosis dari daun sungkai terhadap rasio organ hati mencit putih jantan

Tests of Normality							
	Jenis Fraksi Organ	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual	Fraksi n-heksan	.123	25	.200*	.960	25	.413
	Fraksi etil asetat	.093	25	.200*	.975	25	.762
	Fraksi air	.146	22	.200*	.957	22	.433

Tests of Normality							
	Variasi Dosis Organ	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual	Kontrol (-)	.172	15	.200*	.909	15	.132
	1000 mg/kgBB	.183	15	.189	.945	15	.450
	2000 mg/kgBB	.220	14	.064	.876	14	.051
	4000 mg/kgBB	.186	15	.170	.897	15	.086
	8000 mg/kgBB	.251	13	.024	.848	13	.057

Tabel 35. Hasil uji homogenitas data berdasarkan jenis fraksi dan variasi dosis daun sungkai terhadap rasio organ hati mencit putih jantan

Levene's Test of Equality of Error Variances ^{a,b}					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Rasio Organ Hati	Based on Mean	1.787	14	57	.063
	Based on Median	.769	14	57	.697
	Based on Median and with adjusted df	.769	14	32.544	.693
	Based on trimmed mean	1.719	14	57	.077



Tabel 36. Hasil Uji ANOVA dua arah pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis terhadap rasio organ hati mencit putih jantan

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Rasio Organ Hati					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	63.445 ^a	14	4.532	18.495	.000
Intercept	2487.211	1	2487.211	10150.852	.000
Jenis_Fraksi_Organ	48.695	2	24.348	99.368	.000
Variasi_Dosis_Organ	1.464	4	.366	1.494	.216
Jenis_Fraksi_Organ * Variasi_Dosis_Organ	13.491	8	1.686	6.882	.000
Error	13.966	57	.245		
Total	2626.760	72			
Corrected Total	77.411	71			

Tabel 37. Hasil uji Duncan pengaruh jenis fraksi terhadap rasio organ hati mencit putih jantan

Rasio Organ Hati				
Duncan ^{a,b,c}				
Jenis Fraksi Organ	N	Subset		
		1	2	3
Fraksi n-heksan	25	5.1272		
Fraksi air	22		5.6496	

Fraksi etil asetat	25			7.0384
Sig.		1.000	1.000	1.000

Tabel 38. Hasil uji Duncan pengaruh variasi dosis terhadap rasio organ hati mencit putih jantan

Rasio Organ Hati			
Duncan ^{a,b,c}			
Variasi Dosis Organ	N	Subset	
		1	2
Kontrol (-)	15	5.7174	
2000 mg/kgBB	14	5.9199	5.9199
4000 mg/kgBB	15	5.9781	5.9781
8000 mg/kgBB	13	5.9942	5.9942
1000 mg/kgBB	15		6.1464
Sig.		.178	.271

Tabel 39. Hasil uji normlitas data berdasarkan jenis fraksi dan variasi dosis dari daun sungkai terhadap rasio organ ginjal mencit putih jantan

Tests of Normality							
	Jenis Fraksi Organ	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual	Fraksi n-heksan	.136	25	.200*	.947	25	.214
	Fraksi etil asetat	.118	25	.200*	.954	25	.315
	Fraksi air	.238	21	.051	.835	21	.063

Tests of Normality							
	Variasi Dosis Organ	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual	Kontrol (-)	.123	15	.200*	.972	15	.884
	1000 mg/kgBB	.161	13	.200*	.953	13	.648
	2000 mg/kgBB	.231	13	.056	.829	13	.016
	4000 mg/kgBB	.212	15	.069	.893	15	.074
	8000 mg/kgBB	.176	15	.200*	.902	15	.102

Tabel 40. Hasil uji homogenitas data berdasarkan jenis fraksi dan variasi dosis daun sungkai terhadap rasio organ ginjal mencit putih jantan

Levene's Test of Equality of Error Variances ^{a,b}					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Rasio Organ Ginjal	Based on Mean	2.796	14	56	.003
	Based on Median	.974	14	56	.491
	Based on Median and with adjusted df	.974	14	16.810	.514
	Based on trimmed mean	2.434	14	56	.010

Tabel 41. Hasil Uji Anova dua arah pengaruh jenis fraksi dan variasi dosis terhadap rasio organ ginjal mencit putih jantan

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Rasio Organ Ginjal					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.796 ^a	14	.057	7.555	.000
Intercept	46.101	1	46.101	6121.598	.000
Jenis_Fraksi_Organ	.493	2	.247	32.739	.000
Variasi_Dosis_Organ	.086	4	.022	2.858	.032
Jenis_Fraksi_Organ * Variasi_Dosis_Organ	.210	8	.026	3.480	.003
Error	.422	56	.008		
Total	49.011	71			
Corrected Total	1.218	70			

Tabel 42. Hasil uji Duncan pengaruh jenis fraksi terhadap rasio organ ginjal mencit putih jantan

Rasio Organ Ginjal				
Duncan ^{a,b,c}				
Jenis Fraksi Organ	N	Subset		
		1	2	3
Fraksi n-heksan	25	.7256		
Fraksi air	21		.8110	
Fraksi etil asetat	25			.9232
Sig.		1.000	1.000	1.000

Tabel 43. Hasil uji Duncan pengaruh variasi dosis terhadap rasio organ ginjal
mencit putih jantan

Rasio Organ Ginjal			
Duncan ^{a,b,c}			
Variasi Dosis Organ	N	Subset	
		1	2
Kontrol (-)	15	.7533	
8000 mg/kgBB	15	.8145	.8145
1000 mg/kgBB	13		.8438
2000 mg/kgBB	13		.8485
4000 mg/kgBB	15		.8490
Sig.		.066	.343



Lampiran 4. Data Penunjang

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ANDALAS
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN**

Alamat : Kampus Universitas Andalas, Limau Manis Padang Kode Pos 25163
Telepon : 0751-31746, Faksimile : 0751-32838, Dekan : 0751-39844
Laman : <http://fk.unand.ac.id> e-mail : dekanat@fk.unand.ac.id

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL

No : **79**/UN.16.2/KEP-FK/2022

Tim Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, dalam upaya melindungi Hak Azazi dan Kesejahteraan Subjek Penelitian kedokteran/kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian dengan judul : *The Research Ethics Committee of Medical Faculty Andalas University, in order to protect human rights and welfare of medical health research subject, has carefully reviewed the research protocol entitled :*

**UJI TOKSISITAS AKUT FRAKSI EKSTRAK ETANOL DAUN SUNGKAI
(Peronema canescens Jack.) SERTA PENENTUAN NILAI LD50 PADA
MENCIT PUTIH JANTAN**

Nama Peneliti Utama : Alfathri Yuned
Principal Researcher

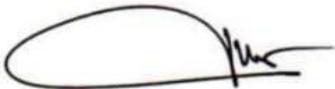
Nama Institusi : Fakultas Farmasi Universitas Andalas
Institution

Protokol Penelitian tersebut dapat disetujui pelaksanaannya.
and approved the research protocol.

Padang, 17 Mei 2022

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
Dean of Medical Faculty Andalas University

Ketua
Chairman



Dr. dr. Afriwardi, SH. Sp.KO, MA
NIP 196704211997021001

Dr. dr. Yuliarni Syafrita, SpS (K)
NIP 196407081991032001

Keterangan/notes:
Keterangan lolos kaji etik ini berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.
This ethical approval is effective for one year from the due date.
Jika ada kejadian serius yang tidak diinginkan (KTD) harus segera dilaporkan ke Komisi Etik Penelitian.
If there are Serious Adverse Events (SAE) should be immediately reported to the Research Ethics Committee.

Gambar 13. Surat keterangan lolos kaji etik



HERBARIUM UNIVERSITAS ANDALAS (ANDA)

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas Kampus Limau Manih Padang Sumbar
Indonesia 25163 Telp. +62-751-777427 ext. *811 e-mail: nas_herb@yahoo.com;
herbariumandaunand@gmail.com

Nomor : 421/K-ID/ANDA/IX/2021
Lampiran : -
Perihal : Hasil Identifikasi

Kepada yth,
Alfathri Yuned
Di
Tempat

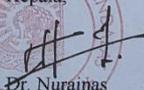
Dengan hormat,
Sehubungan dengan surat mengenai bantuan untuk "Identifikasi Tumbuhan" di Herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, kami telah membantu mengidentifikasi tumbuhan yang dibawa, atas nama:

Nama : Alfathri Yuned
No. BP : 1811013018
Instansi : Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Berikut ini diberikan hasil identifikasi yang dikeluarkan dari Herbarium Universitas Andalas.

No	Family	Spesies
1.	Lamiaceae	<i>Peronema canescens</i> Jack

Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.

Padang, 28 September 2021
Kepala,

Dr. Nurainas
NIP. 196908141995122001

Gambar 14. Hasil identifikasi tumbuhan



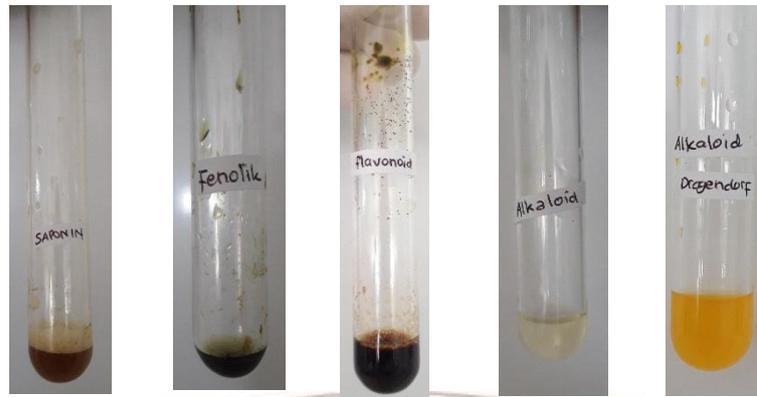
Gambar 15. Pengambilan daun sungkai



Gambar 16. Maserat daun sungkai

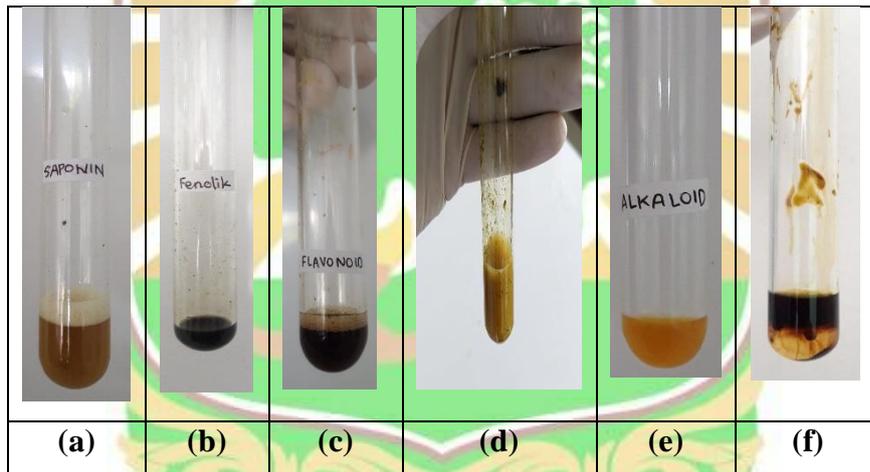


Gambar 17. Ekstrak etanol daun sungkai



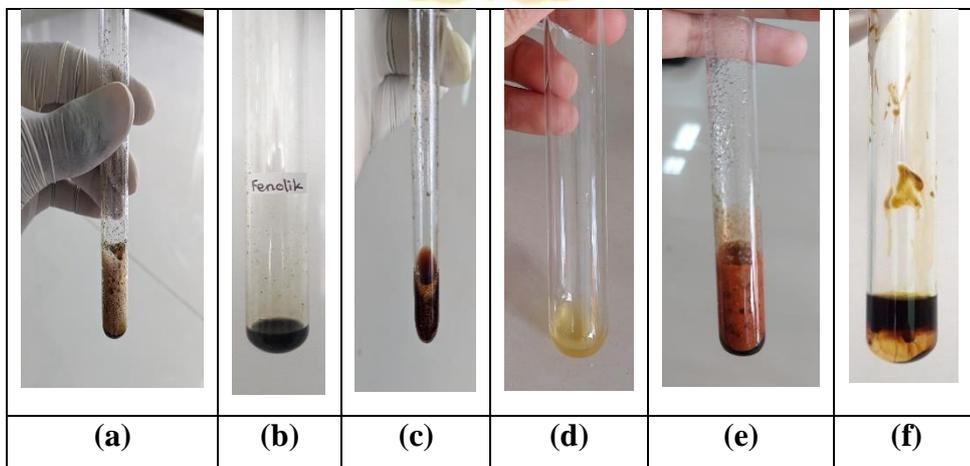
(a) (b) (c) (d) (e)

Gambar 18. Hasil skrining fitokimia fraksi etil asetat daun sungkai



(a) (b) (c) (d) (e) (f)

Gambar 19. Hasil skrining fitokimia fraksi n-heksan daun sungkai



(a) (b) (c) (d) (e) (f)

Gambar 20. Hasil skrining fitokimia fraksi air daun sungkai

Keterangan:

- (a) Uji Saponin
- (b) Uji Fenolik
- (c) Uji Flavonoid
- (d) Uji Alkaloid dengan Mayer
- (e) Uji Alkaloid dengan Dragendorff
- (f) Uji Terpenoid



Gambar 21 Pengeringan organ hati dan ginjal



Gambar 22. Sediaan suspensi fraksi daun sungkai