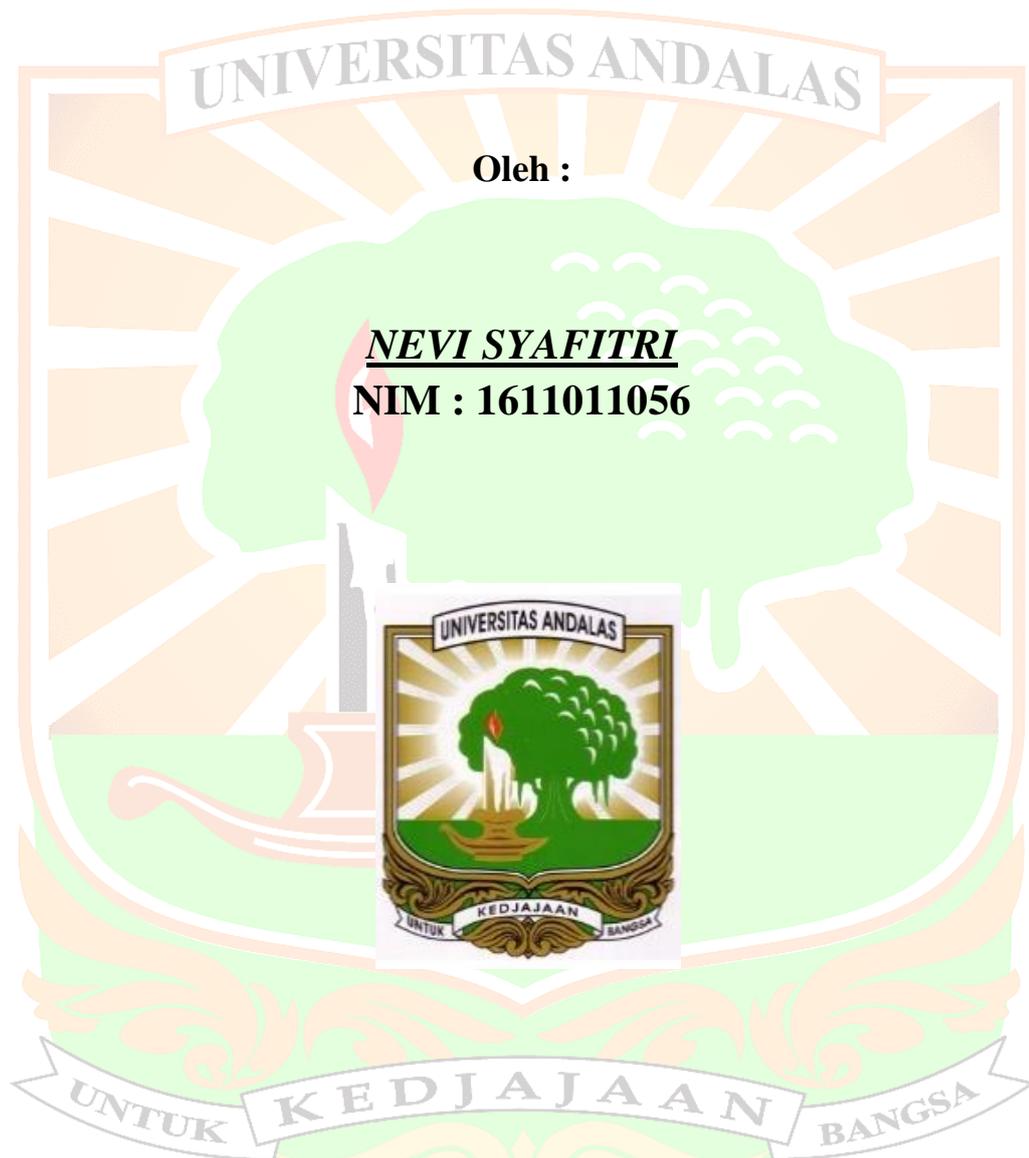


**KAJIAN TOKSISITAS AKUT DAN TOKSISITAS  
TERTUNDA DARI EKSTRAK ETANOL DAUN  
DEWANDARU (*Eugenia uniflora* L.) PADA MENCIT  
PUTIH BETINA**



Oleh :

**NEVI SYAFITRI**  
**NIM : 1611011056**

**FAKULTAS FARMASI**  
**UNIVERSITAS ANDALAS**  
**PADANG**

**2020**

## PERNYATAAN ORISINALITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Nevi Syafitri

No. BP : 1611011056

Judul Skripsi : Kajian Toksisitas Akut Dan Toksisitas Tertunda dari Ekstrak Etanol Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora L.*) pada Mencit Putih Betina

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini saya tulis merupakan karya saya sendiri, terhindar dari unsur plagiatisme 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.

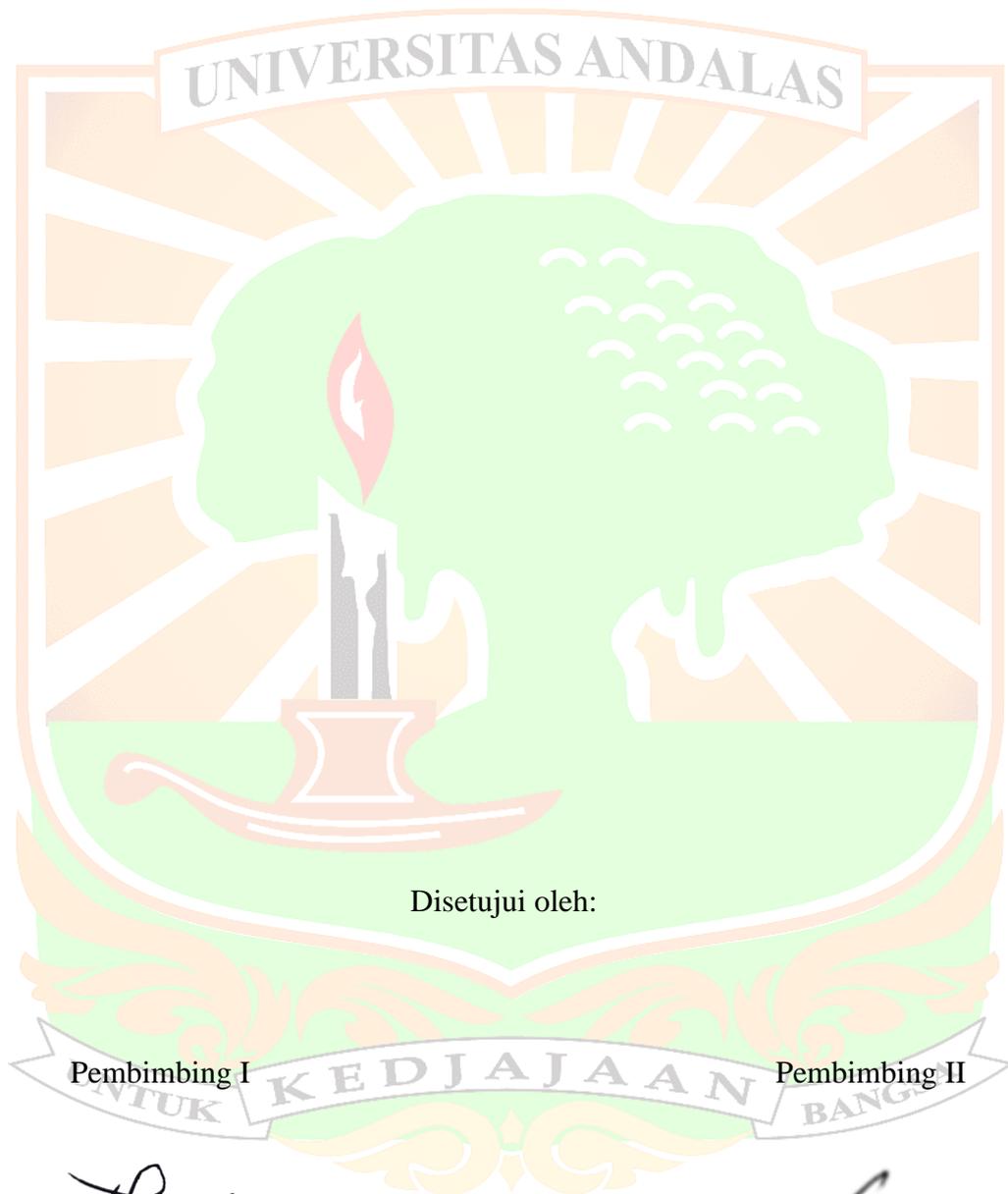
Padang, 15 Mei 2020

  
Nevi Syafitri

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menempuh ujian

Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi

Universitas Andalas



Disetujui oleh:

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr. apt. Helmi Arifin**  
NIP. 19541122 198503 1 002

**apt. Rahmi Yosmar, M.Farm**  
NIP. 19851017 20101 2 2005

**Skripsi ini telah dipertahankan pada Seminar Hasil Penelitian**

**Fakultas Farmasi**

**Universitas Andalas**

**Padang**

**Pada tanggal : 11 Juni 2020**

No	Nama	Jabatan	Tanda Tangan
1	Prof. Dr. apt. Almahdy A	Ketua	
2	Prof. Dr. apt. Helmi Arifin	Pembimbing 1	
3	apt. Rahmi Yosmar, M.Farm	Pembimbing 2	
4	Dr. Netty Suhari, MS	Anggota	
5	apt. Dian Ayu Juwita, M.Farm	Anggota	

UNTUK

KEDJAJAAN

BANGSA

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamiin, puji dan syukur kehadirat Allah S.W.T dan Shalawat beserta salam untuk Nabi Muhammad S.A.W, berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **Kajian Toksisitas Akut Dan Toksisitas Tertunda Dari Ekstrak Etanol Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora L.*) Pada Mencit Putih Betina** yang merupakan salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Andalas.

Penyusunan skripsi ini berhasil berkat bantuan oleh berbagai pihak. Ucapan terimakasih dari penulis kepada:

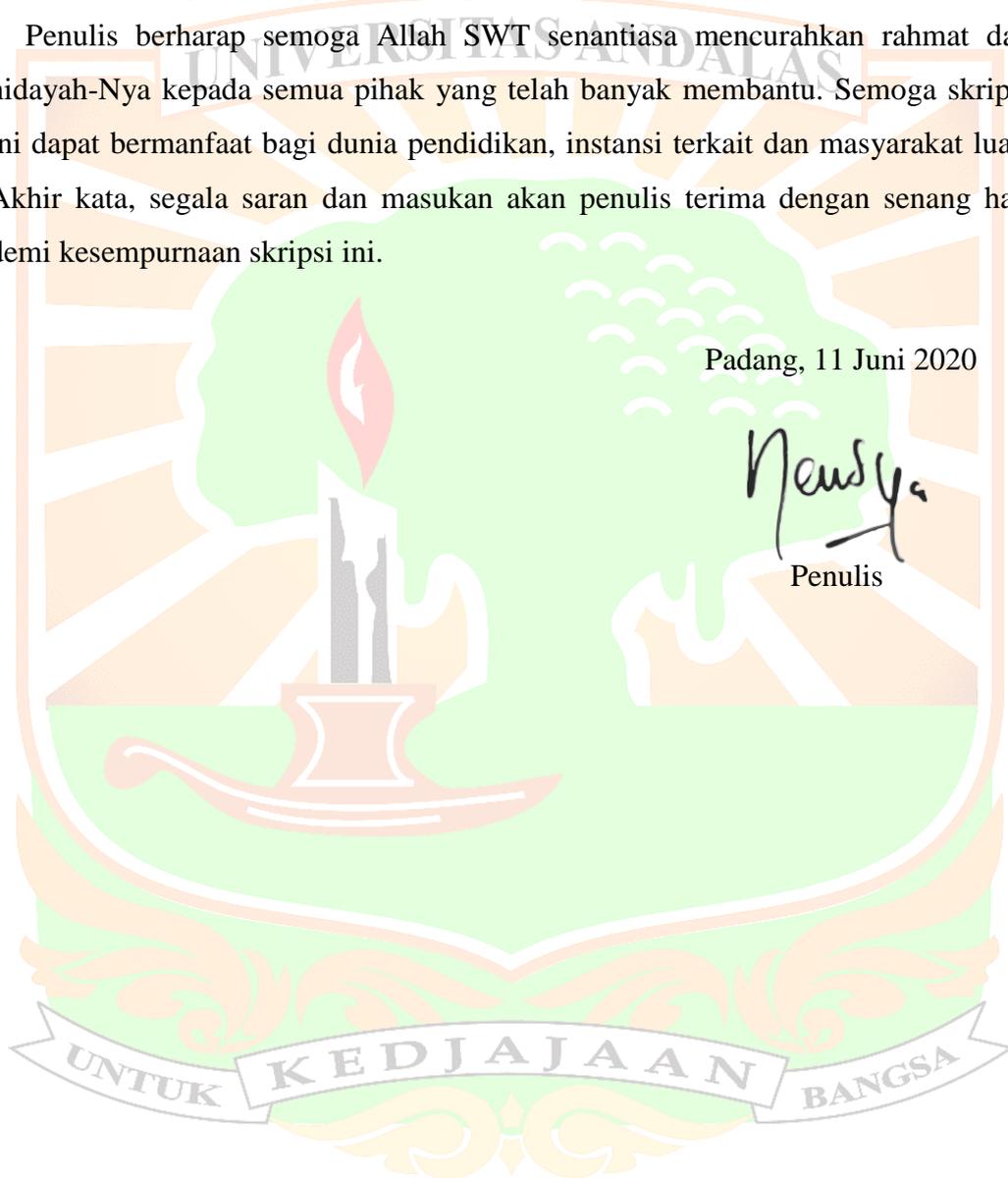
1. Prof. apt. Fatma Sri Wahyuni, Ph.D selaku Dekan beserta Wakil Dekan Fakultas Farmasi Universitas Andalas.
2. Prof. apt. Helmi Arifin, MS, Ph.D dan apt. Rahmi Yosmar, M. Farm selaku Dosen Pembimbing yang sangat sabar dan meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, saran, dan arahan selama penyusunan skripsi ini.
3. Bapak/Ibu selaku tim penguji skripsi yang telah memberikan masukan serta saran demi kesempurnaan skripsi ini.
4. Prof. Dr. apt. Akmal Djamaan selaku Pembimbing Akademik yang telah memacu semangat penulis untuk menuntut ilmu lebih giat lagi selama masa studi.
5. Seluruh dosen pengajar di Fakultas Farmasi Universitas Andalas yang telah memberikankan ilmu pengetahuan kepada penulis.
6. Syafnil (Papa) tercinta yang tidak pernah lelah bekerja, menasehati, memotivasi dan mendidik anaknya hingga menjadi seperti sekarang. Gusti Sriyenti (Mama) tercinta yang selalu mendegarkan keluh kesah, memberi semangat, mendidik, dan mendoakan anaknya dengan sepenuh hati. Terimakasih untuk kasih sayang yang tak pernah henti-hentinya kalian berikan.
7. Untuk kakak-kakak tercinta Nova Syafrina, Amd. Kep dan Nivo Wulandari, SE terima kasih telah memberikan arahan, saran, dan semangat yang tiada henti.

8. Lutfhian Ausri, Keluarga Perseus, Dewandaru Squad serta sahabat-sahabat tercinta (ACNR, Itunes, Ghina Muthmainnah, Diena Ade Novira, Rima Jumeini Cahayu, dan Atika Prima Hardani) yang telah membantu dan selalu memberikan dorongan dari awal penyusunan skripsi ini.
9. Serta semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu.

Penulis berharap semoga Allah SWT senantiasa mencurahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada semua pihak yang telah banyak membantu. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi dunia pendidikan, instansi terkait dan masyarakat luas. Akhir kata, segala saran dan masukan akan penulis terima dengan senang hati demi kesempurnaan skripsi ini.

Padang, 11 Juni 2020

*Newsya*  
Penulis



## ABSTRAK

### KAJIAN TOKSISITAS AKUT DAN TOKSISITAS TERTUNDA DARI EKSTRAK ETANOL DAUN DEWANDARU (*Eugenia uniflora* L.) PADA MENCIT PUTIH BETINA

Oleh :

**NEVI SYAFITRI**

**NIM : 1611011056**

**(Program Studi Sarjana Farmasi)**

Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) memiliki banyak efek farmakologis diantaranya sebagai antidiabetes, antihipertensi, antikolesterol, hepatoprotektor dll. Uji toksisitas penting dilakukan sebagai uji awal (*screening test*) pada suatu produk obat yang akan dipasarkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi keamanan ekstrak daun dewandaru melalui paparan akut oral. Metode pengujian toksisitas akut yang dipilih berdasarkan *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) 423 yang dimodifikasi pada mencit putih betina. Penelitian ini menggunakan 18 mencit yang dibagi menjadi 6 kelompok dengan dosis awal 300 mg/kg. Jumlah kematian dicatat dalam waktu 24 jam dan LD<sub>50</sub> ditentukan berdasarkan kategori GHS (*Globally Harmonized Classification System*). Pengujian toksisitas tertunda dilakukan selama 14 hari pada mencit yang masih hidup. Parameter yang dicatat adalah persen perubahan berat badan, jumlah konsumsi makan, jumlah konsumsi minum, dan persen rasio bobot organ. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak daun dewandaru diklasifikasikan ke dalam kategori “unclassified” (nilai LD<sub>50</sub> >5000 mg/kg). Gejala toksik yang tercatat antara lain diare, terengah-engah, tremor, salivasi dan penurunan aktivitas motorik. Analisa statistik menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara faktor perlakuan dan interaksinya terhadap jumlah konsumsi makan dan jumlah konsumsi minum ( $p < 0,05$ ). Persentase perubahan berat badan menunjukkan waktu dan interaksi faktor perlakuan tidak memiliki pengaruh yang signifikan ( $p > 0,05$ ), namun dosis memberikan pengaruh yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Persen rasio bobot organ menunjukkan dosis tidak memberikan pengaruh yang signifikan ( $p > 0,05$ ). Dapat disimpulkan ekstrak daun dewandaru tidak toksik pada paparan akut oral dan memberikan efek toksik tertunda.

Kata kunci : *Eugenia uniflora* L., Uji Toksisitas Akut, Uji Toksisitas Tertunda, OECD 423, GHS

## ABSTRACT

### ACUTE AND DELAYED TOXICITY STUDY OF ETHANOLIC EXTRACT FROM DEWANDARU (*Eugenia uniflora* L.) LEAVES IN FEMALE WHITE MICE

By : UNIVERSITAS ANDALAS

NEVI SYAFITRI

Student ID Number : 1611011056

(Bachelor of Pharmacy)

Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) leaves have many pharmacological effects such as antidiabetic, antihypertensive, anticholesterol, hepatoprotector and etc. Toxicity test is required as preliminary research of candidate medicine. The study aimed to evaluate safety of Dewandaru leaves extract through acute oral exposure. Acute toxicity test method was selected based on the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) 423, which was modified in female white mice. The research used 18 mice that divided into 6 groups with 300 mg/kgBW as initial dose. The number of deaths was recorded in 24 hours and the LD<sub>50</sub> was determined based on GHS (Globally Harmonized Classification System) category. The delayed toxicity test was conducted for 14 days with alive mice. The parameters were percentage change in body weight, food and water intakes, and organs weigh ratio such as heart, liver, and kidneys. The results showed that Dewandaru leaves extract was classified into “unclassified” category (LD<sub>50</sub>>5000 mg/kgBW). The recorded toxic symptoms were diarrhea, tremor, salivation, and decreased of motoric activity. Statistical analysis showed that there were significant differences between factors and their interactions toward food parameter and water intake parameter ( $p < 0,05$ ). The result of percentage change in body weight showed time and interaction of the treatment factor were not significantly affect the percentage change in body weight ( $p > 0,05$ ), however the dosage gave significantly different. Percentage of organ weigh ratio showed that dosage did not affect the percentage of organ weight ratio significantly ( $p > 0,05$ ). It can be conclude that Dewandaru leaves extract is not toxic through acute oral exposure and produced delayed toxicity.

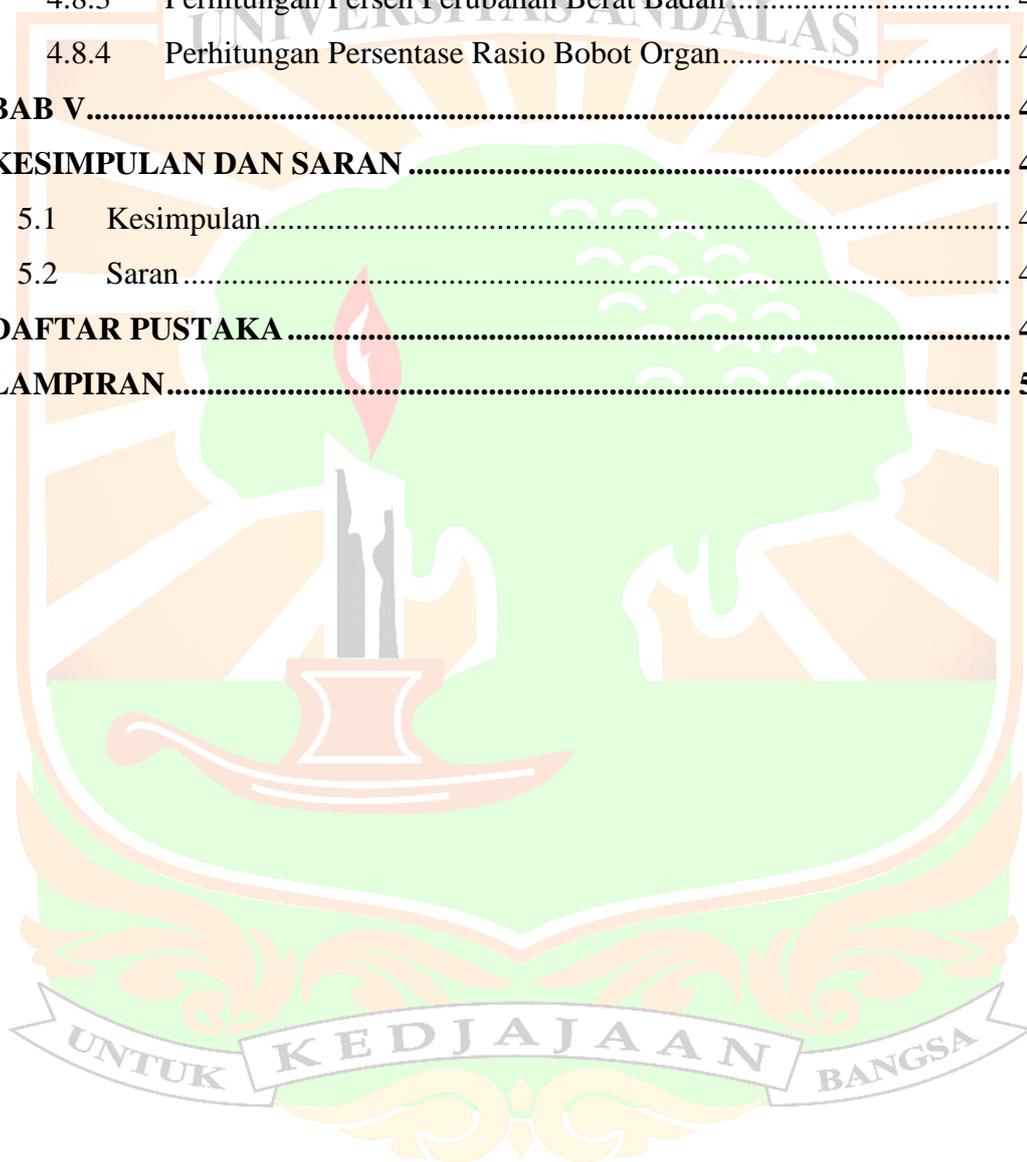
Keywords : *Eugenia uniflora* L., Acute Toxicity Testing, Delayed Toxicity Testing, OECD 423, GHS.

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN PEMBIMBING .....</b>	<b>iii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN PENGUJI.....</b>	<b>iii</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xv</b>
<b>BAB I.....</b>	<b>1</b>
<b>PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
<b>BAB II .....</b>	<b>5</b>
<b>TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Tinjauan Botani Dewandaru.....	5
2.1.1 Klasifikasi Tanaman.....	5
2.1.2 Nama Lain.....	5
2.1.3 Morfologi Tanaman .....	6
2.1.4 Kandungan Kimia .....	6
2.1.5 Habitat dan Penyebaran.....	6
2.1.6 Khasiat Tumbuhan dan Bioaktivitas .....	7
2.2 Ekstraksi .....	7
2.2.1 Pengertian Ekstrak .....	7
2.2.2 Pengertian Ekstraksi.....	8
2.2.3 Metode Ekstraksi.....	8
2.3 Penguapan .....	10

2.4	Uji Fitokimia .....	11
2.5	Toksisitas .....	12
2.5.1	Target Organ .....	13
2.5.2	Ketentuan Umum Uji Toksisitas .....	14
2.5.3	Uji Toksisitas Akut .....	15
<b>BAB III</b>	<b>.....</b>	<b>26</b>
<b>METODE PENELITIAN</b>	<b>.....</b>	<b>26</b>
3.1	Tempat dan Waktu Penelitian .....	26
3.2	Alat dan Bahan .....	26
3.2.1	Alat .....	26
3.2.2	Bahan .....	26
3.2.3	Hewan .....	26
3.3	Prosedur Penelitian .....	27
3.3.1	Pengambilan Sampel .....	27
3.3.2	Identifikasi Tanaman .....	27
3.3.3	Penyiapan Simplisia .....	27
3.3.4	Pembuatan ekstrak daun Dewandaru .....	27
3.3.5	Karakteristik Ekstrak .....	27
3.3.6	Aklimatisasi Hewan Percobaan .....	30
3.3.7	Dosis .....	30
3.3.8	Pembuatan Sediaan Uji .....	30
3.3.9	Pengujian Toksisitas Akut .....	31
3.3.10	Pengamatan Efek Toksik Tertunda Selama 14 hari (15) .....	31
3.3.11	Analisa Data .....	32
<b>BAB IV</b>	<b>.....</b>	<b>33</b>
<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	<b>.....</b>	<b>33</b>
4.1	Penentuan Rendemen .....	33
4.2	Pemeriksaan Organoleptis .....	34
4.3	Penentuan Susut Pengerangan .....	34
4.4	Penentuan Nilai Kadar Abu Total .....	35
4.5	Pengujian Fitokimia .....	36

4.6	Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	37
4.7	Pengujian Toksisitas Akut.....	38
4.8	Pengujian Toksisitas Tertunda .....	41
4.8.1	Perhitungan Jumlah Konsumsi Makan.....	41
4.8.2	Perhitungan Jumlah Konsumsi Minum.....	43
4.8.3	Perhitungan Persen Perubahan Berat Badan.....	44
4.8.4	Perhitungan Persentase Rasio Bobot Organ.....	45
<b>BAB V</b>	.....	<b>47</b>
<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b>	.....	<b>47</b>
5.1	Kesimpulan.....	47
5.2	Saran.....	47
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	.....	<b>48</b>
<b>LAMPIRAN</b>	.....	<b>53</b>



## DAFTAR LAMPIRAN

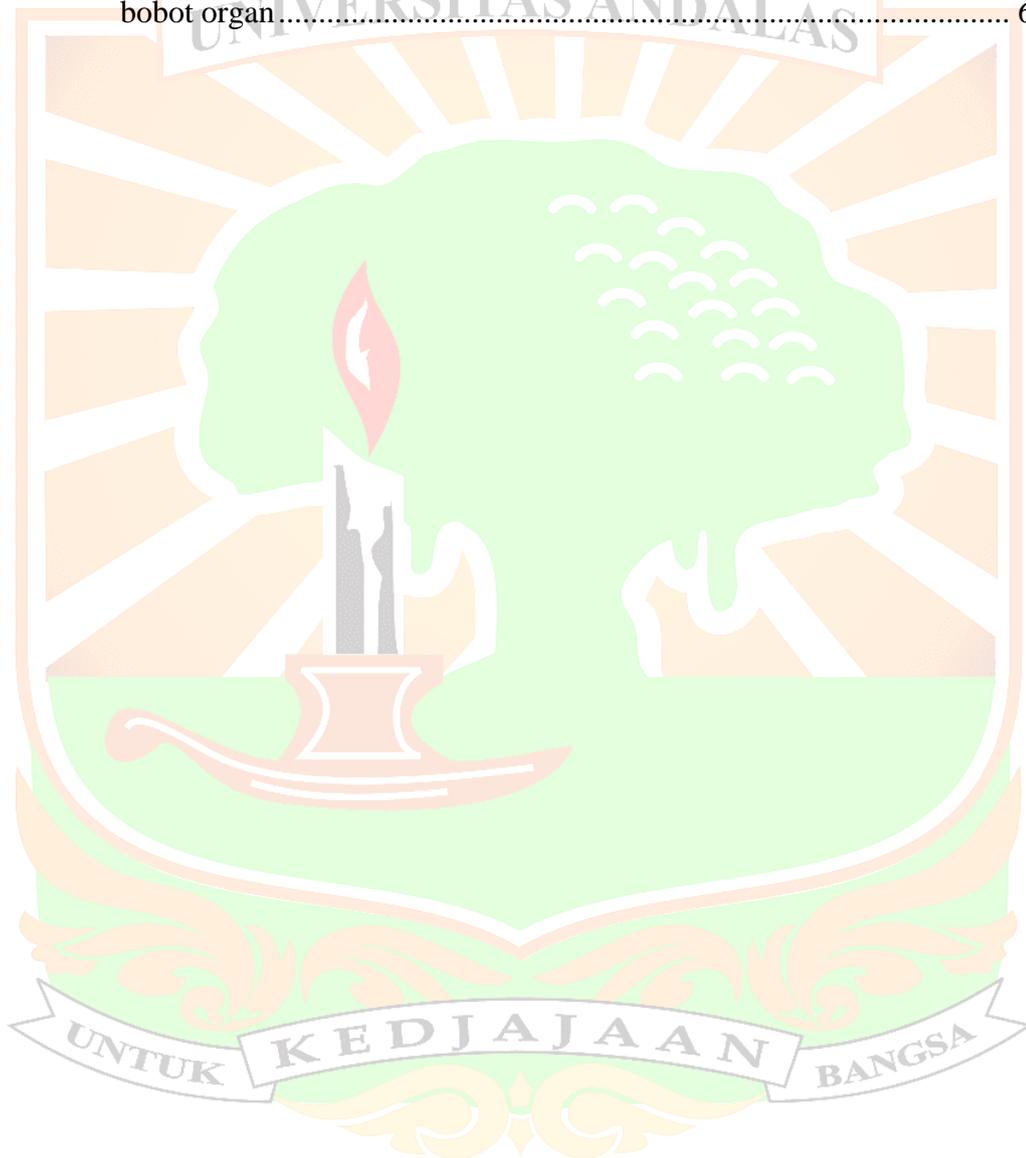
Lampiran 1. Data Penelitian.....	53
Lampiran 2. Data Perhitungan Statistik .....	59
Lampiran 3. Data Penunjang.....	68



## DAFTAR TABEL

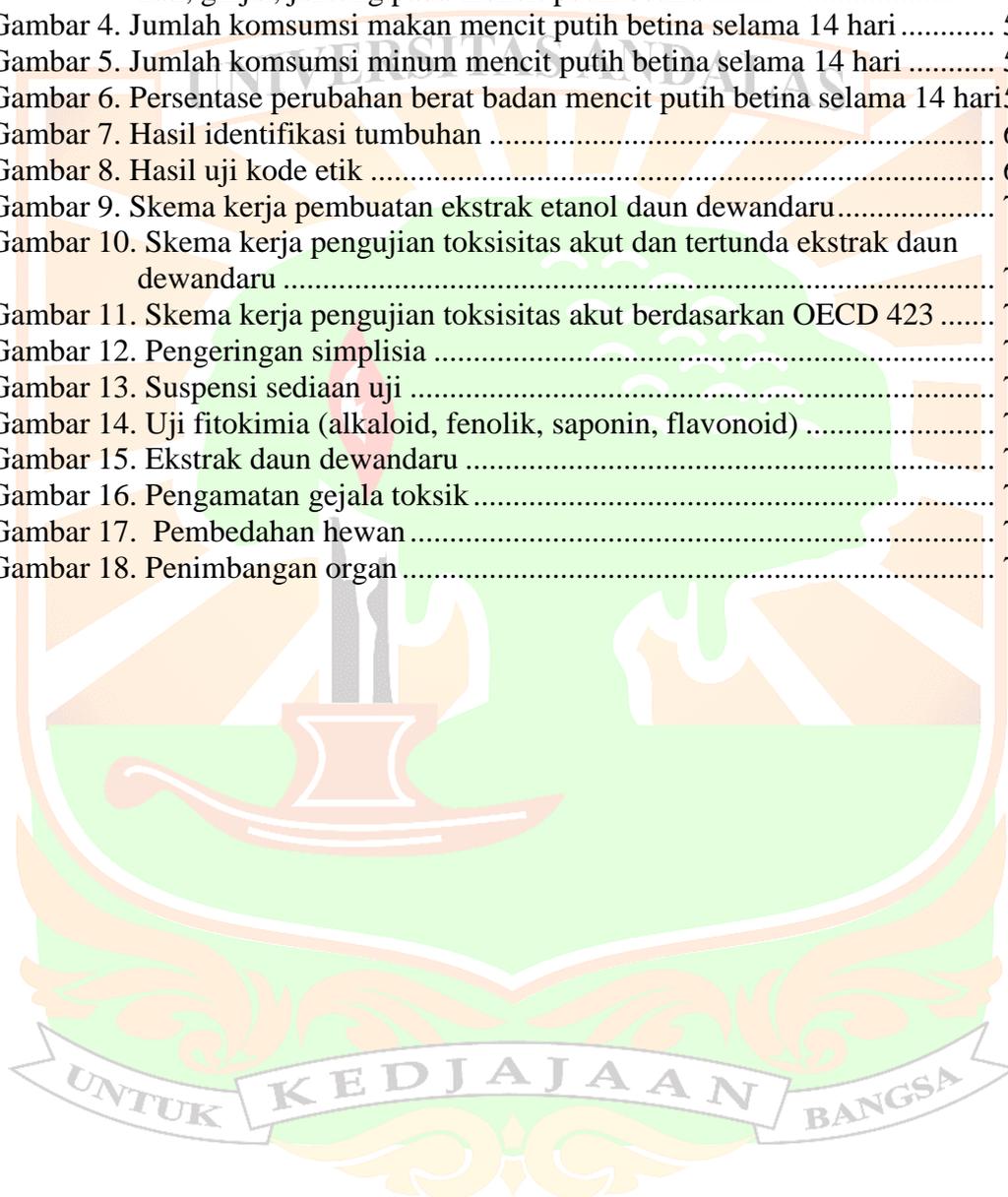
Tabel 1. Tanda toksik pada organ atau sistem. ....	17
Tabel 2. Klasifikasi toksisitas. ....	19
Tabel 3. Kriteria penggolongan sediaan uji menurut OECD 420. ....	20
Tabel 4. Pedoman OECD untuk studi toksisitas ....	21
Tabel 5. Hasil pemeriksaan organoleptis ....	34
Tabel 6. Hasil penentuan susut pengeringan.....	35
Tabel 7. Hasil penentuan kadar abu total.....	36
Tabel 8. Hasil pemeriksaan kandungan golongan metabolit sekunder.....	37
Tabel 9. Pengamatan gejala toksik secara visual.....	40
Tabel 10. Pengaruh dosis dan waktu terhadap jumlah konsumsi makan mencit putih betina selama 14 hari.....	42
Tabel 11. Pengaruh dosis dan waktu terhadap jumlah konsumsi minum mencit putih betina selama 14 hari.....	43
Tabel 12. Pengaruh dosis dan waktu terhadap persen perubahan berat badan mencit putih betina selama 14 hari.....	44
Tabel 13. Data hasil selisih berat badan mencit putih betina selama 5 hari aklimatisasi.....	53
Tabel 14. Jumlah konsumsi makan mencit putih betina selama 14 hari.....	54
Tabel 15. Jumlah konsumsi minum mencit putih betina selama 14 hari.....	55
Tabel 16. Persentase perubahan berat badan mencit putih betina selama 14 hari.....	56
Tabel 17. Persen rasio bobot organ mencit putih betina.....	57
Tabel 18. Hasil uji normalitas jumlah konsumsi makan mencit terhadap kelompok perlakuan.....	59
Tabel 19. Hasil uji normalitas jumlah konsumsi makan mencit terhadap waktu pengamatan.....	59
Tabel 20. Hasil perhitungan statistik ANOVA dua arah terhadap jumlah konsumsi makan mencit.....	60
Tabel 21. Hasil uji lanjut jarak berganda duncan terhadap jumlah konsumsi makan mencit dari faktor perlakuan/dosis.....	60
Tabel 22. Hasil uji lanjut jarak berganda duncan terhadap jumlah konsumsi makan mencit dari faktor waktu pengamatan.....	61
Tabel 23. Hasil uji normalitas jumlah konsumsi minum mencit terhadap kelompok perlakuan.....	61
Tabel 24. Hasil uji normalitas konsumsi minum mencit terhadap waktu pengamatan.....	62
Tabel 25. Hasil perhitungan statistik ANOVA dua arah terhadap jumlah konsumsi minum mencit.....	62
Tabel 26. Hasil uji lanjut jarak berganda duncan terhadap jumlah konsumsi minum mencit dari faktor perlakuan/dosis.....	63
Tabel 27. Hasil uji lanjut jarak berganda duncan terhadap jumlah konsumsi minum mencit dari faktor waktu pengamatan.....	63
Tabel 28. Hasil uji normalitas persen perubahan berat badan mencit terhadap kelompok perlakuan.....	64

Tabel 29. Hasil uji normalitas persen perubahan berat badan mencit terhadap waktu pengamatan .....	64
Tabel 30. Hasil perhitungan statistik ANOVA dua arah terhadap persen perubahan berat badan mencit.....	65
Tabel 31. Hasil uji lanjut jarak berganda duncan terhadap persen perubahan berat badan mencit dari faktor perlakuan/dosis.....	65
Tabel 32. Hasil uji normalitas persen rasio bobot organ.....	66
Tabel 33. Hasil perhitungan statistik ANOVA satu arah terhadap persen rasio bobot organ.....	67



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tanaman Dewandaru.....	5
Gambar 2. Hasil analisis KLT (kromatografi lapis kertas).....	38
Gambar 3. Diagram batang hubungan dosis terhadap persentasi rasio bobot organ hati, ginjal, jantung pada mencit putih betina .....	46
Gambar 4. Jumlah komsumsi makan mencit putih betina selama 14 hari.....	58
Gambar 5. Jumlah komsumsi minum mencit putih betina selama 14 hari .....	58
Gambar 6. Persentase perubahan berat badan mencit putih betina selama 14 hari.....	58
Gambar 7. Hasil identifikasi tumbuhan .....	68
Gambar 8. Hasil uji kode etik .....	69
Gambar 9. Skema kerja pembuatan ekstrak etanol daun dewandaru.....	70
Gambar 10. Skema kerja pengujian toksisitas akut dan tertunda ekstrak daun dewandaru .....	71
Gambar 11. Skema kerja pengujian toksisitas akut berdasarkan OECD 423 .....	72
Gambar 12. Pengeringan simplisia .....	73
Gambar 13. Suspensi sediaan uji .....	73
Gambar 14. Uji fitokimia (alkaloid, fenolik, saponin, flavonoid) .....	73
Gambar 15. Ekstrak daun dewandaru .....	74
Gambar 16. Pengamatan gejala toksik.....	74
Gambar 17. Pembedahan hewan.....	74
Gambar 18. Penimbangan organ.....	74



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang

Obat tradisional merupakan suatu bahan atau campuran bahan baik berupa hewan, tumbuhan, mineral, cairan ataupun campuran dari bahan tersebut yang digunakan oleh masyarakat secara turun temurun dan telah terbukti dalam pengobatan tradisional (1). Bahan alam yang dimanfaatkan sebagai obat, terutama tumbuhan, hewan atau biota laut memiliki banyak kandungan kimia yang terkandung didalamnya. Zaman sekarang, banyak obat yang telah dihasilkan dari pengembangan senyawa yang berpotensi aktif dari bahan alam, baik bahan alam dari darat maupun dari laut (2).

Penggunaan obat-obatan yang berasal dari tumbuhan sudah digunakan dalam semua peradaban dan budaya. Oleh karena itu tumbuhan memiliki peran penting dalam sistem pengobatan diseluruh dunia. Disebagian besar Negara berkembang penggunaan obat herbal merupakan bagian terapi yang dominan digunakan dalam penyembuhan penyakit (3).

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki keanekaragaman hayati. Diperkirakan, di hutan tropis Indonesia ini memiliki sekitar 9.600 jenis tumbuhan yang diketahui memiliki khasiat sebagai obat dan diantaranya terdapat 200 jenis tumbuhan obat penting yang sangat memiliki manfaat besar bagi industri farmasi di Indonesia (4). Tentu saja bagi pemerintah Indonesia, obat tradisional merupakan suatu aset. Karena meningkatnya harga obat dan terbatasnya daya beli masyarakat menjadikan obat tradisional sebagai suatu alternatif bagi masyarakat Indonesia sebagai tujuan dalam menjaga kesehatan maupun pengobatan sendiri.

Salah satu tanaman yang dapat dijadikan obat adalah daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.). Dari beberapa penelitian diketahui bahwa daun Dewandaru ini memiliki banyak kandungan kimia salah satunya adalah golongan senyawa kimia tannin, saponin, vitamin C, golongan senyawa kimia flavonoid, antosianin, golongan fenolik dan beberapa minyak atsiri seperti sitronela, sineol, dan

sesquiterpen (4). Infusa daun Dewandaru di Brazil digunakan sebagai pengobatan masalah perut, sedangkan di Suriname ekstraksi dekokta daun Dewandaru digunakan sebagai obat penurun panas yang dikombinasikan dengan daun serai (5). Dekoksi air dari tanaman ini juga digunakan sebagai penurun kolesterol dan tekanan darah yang sering digunakan di Paraguay (6). Sementara itu, bagi masyarakat Indonesia, dewandaru dimanfaatkan sebagai pengobatan masalah bibir pecah-pecah, sariawan, gusi berdarah, dan obat pendingin tubuh (7).

Beberapa penelitian yang menguji bioaktivitas daun Dewandaru antara lain pengujian aktivitas analgetik menggunakan mencit putih jantan dimana dari hasil pengujian ekstrak kental daun Dewandaru dengan dosis 200 mg/kg mempunyai efek analgetik yang paling efektif (8). Penelitian lainnya yaitu pengujian aktivitas antihipertensi dari ekstrak etanol daun Dewandaru pada tikus putih jantan memberikan efek yang setara dengan Kaptopril pada dosis 1,2 mg/200 g BB (9). Selanjutnya untuk pengujian efek sitotoksik ekstrak daun Dewandaru terhadap sel kanker payudara T47D diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 117  $\mu\text{g/mL}$  sedangkan terhadap sel kanker payudara MCF-7 diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 155  $\mu\text{g/mL}$  (10).

Efek dari semua produk alam dapat terbatasi oleh sifat toksiknya. Mengevaluasi toksisitas zat adalah salah satu langkah penting karena beberapa obat-obatan memiliki nilai toksisitas yang tinggi dan dapat mempengaruhi jaringan (11). Pentingnya dilakukan pengujian toksisitas salah satunya yaitu dapat menggambarkan kerusakan yang diakibatkan suatu senyawa baik senyawa alam maupun senyawa kimia sintesis (12).

Begitupun dengan obat tradisional, walaupun obat tradisional sudah dimanfaatkan sejak lama dan digunakan secara turun temurun, bisa saja obat tradisional ini tidak aman dikonsumsi, karena bahan alam yang terkandung didalam obat tradisional ini juga merupakan senyawa asing bagi tubuh. Efek toksik yang terjadi pada makhluk hidup dapat dilihat dan dapat juga tidak, bergantung pada dosis yang diserap tubuh (13). Survei terbaru juga melaporkan bahwa obat tradisional menimbulkan efek samping (3), karena itulah penting untuk mengetahui sifat ketoksikannya. Pengujian ini lazim dilakukan untuk setiap tumbuhan sebelum dilaporkan penggunaannya untuk tujuan pengobatan (14).

Secara umum, pengujian toksisitas bertujuan untuk mengetahui efek yang tidak diharapkan oleh suatu bahan obat terutama terhadap efek kanker, gangguan jantung dan iritasi kulit atau mata (12). Dalam pengujian toksisitas akut perlu diperhatikan efek toksik segera dan efek toksik tertunda. Efek toksik segera dapat didefinisikan sebagai efek yang terjadi atau berkembang dengan cepat setelah satu kali dosis tunggal calon obat diadministrasikan, sedangkan efek toksik yang tertunda adalah efek yang terjadi setelah selang beberapa waktu (15).

Penelitian toksisitas akut ekstrak etanol buah Dewandaru yang dilakukan oleh Onwudiwe menghasilkan nilai LD<sub>50</sub> pada dosis 2408,3 mg/kg. Dosis ini termasuk dalam kategori toksisitas ringan (5). Sedangkan penelitian toksisitas akut ekstrak infusa dan dekokta daun Dewandaru yang dilakukan oleh Schapoval pada dosis 300mg/kg tidak menghasilkan efek toksik yang berlebihan (16).

Peneliti menguji toksisitas akut oral ekstrak daun Dewandaru menggunakan metode OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) yaitu *Acute Toxic Class Method* (OECD 423) yang dimodifikasi untuk mengetahui nilai LD<sub>50</sub> dan klasifikasi GHS (*Globally Harmonised Classification System*) beserta gejala toksik yang menyertainya setelah pemberian ekstrak daun Dewandaru dosis tunggal dalam waktu 24 jam. Selanjutnya perlu dilakukan penelitian toksisitas tertunda ekstrak daun Dewandaru dengan melakukan pengamatan selama 14 hari untuk melihat efek pada organ yang muncul lambat tidak luput dari pengamatan.

## **1.2. Rumusan Masalah**

1. Berapakah nilai LD<sub>50</sub> dan klasifikasi GHS ekstrak etanol daun Dewandaru melalui uji toksisitas akut oral OECD TG 423?
2. Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak etanol daun Dewandaru terhadap perilaku mencit melalui uji toksisitas akut?
3. Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak etanol daun Dewandaru terhadap persen perubahan berat badan, jumlah konsumsi makan, jumlah konsumsi minum, persen rasio organ hati, jantung, dan ginjal mencit melalui uji toksisitas tertunda?

### 1.3. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui nilai LD50 dan klasifikasi GHS ekstrak etanol daun Dewandaru melalui uji toksisitas akut oral OECD TG 423
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun Dewandaru terhadap perilaku mencit melalui uji toksisitas akut
3. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun Dewandaru terhadap persen perubahan berat badan, jumlah konsumsi makan, jumlah konsumsi minum, persen rasio organ hati, jantung, dan ginjal mencit melalui uji toksisitas tertunda.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Botani Dewandaru

##### 2.1.1 Klasifikasi Tanaman

Klasifikasi tanaman Dewandaru menurut (17) sebagai berikut :



Gambar 1. Tanaman Dewandaru

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyleoneae

Ordo : Myrtales

Famili : Myrtaceae

Genus : Eugenia

Spesies : *Eugenia uniflora* L. (17).

##### 2.1.2 Nama Lain

Cereme asam (Melayu), Asem selong, Belimbing londo, Dewandaru (Jawa) (17). Arrayán (Argentina), Cerisier De Cayenne (Brazil), Pitangueira (Portugis), Hong Guo Zi (China), Pendanga (Venezuela), Cayennekirsche, Surinamkirsche (Jerman) (18) Pitanga and Brazilian Cherry (19).

### 2.1.3 Morfologi Tanaman

Tumbuhan Dewandaru memiliki ciri berkayu tegak, warna coklat, bulat (17). Berbentuk perdu atau pohon, bercabang banyak, dan tinggi pohon mencapai 5 m (20). Jenis daun tunggal, berbentuk bulat telur, permukaan daun halus (20), berwarna hijau pertulangan daun menyirip, ujung dan pangkal runcing, tepi daun merata, panjang sekitar  $\pm$  5 cm, lebar 4 cm. Jenis bunga tunggal, memiliki kelamin ganda, daun pelindung kecil, berwarna hijau, kelopak bunga tiga sampai lima, memiliki banyak benang sari, bewarna putih, bentuk putik silindris, mahkota bunga berbentuk kuku, dan berwarna kuning. Buah berbentuk bulat, diameter 1,5 cm, berwarna merah. Biji berwarna coklat, keras dan kecil (17), berbiji 1-2 (20). Jenis akar tunggang, berwarna coklat (17).

### 2.1.4 Kandungan Kimia

Daun Dewandaru mengandung senyawa kimia sesquiterpen teroksigenasi yang mempunyai daya aktivitas antijamur yaitu Curzeren (isofuranegermacrene), germacren B, dan atractylon (20). Pada daun nya juga terdapat ikatan tannin terhidrolisis yang bernama Eugeniflorins D1 dan Eugeniflorins D2 (18). Minyak daun Dewandaru juga mengandung selina-1,3,7(11)-trien-8-one dan selina-1,3,7(11)-trien-8-one-epoksida. Sitronela, sineol, terpenin, sesquiterpen, vitamin C, saponin, flavonoid, tannin, dan antosianin (20). Pada penelitian Becker dkk, didapatkan 12 jenis senyawa kimia dari daun Dewandaru antara lain trans- $\beta$ -ocimene, cis- $\beta$ -ocimene, caryophyllene, allo-aromadendrene,  $\beta$ -copaene,  $\alpha$ -muurolene, (+)- $\delta$ -cadinene, spathulenol, viridiflorol, isolongifolene, 9, 10-dehydro-,  $\alpha$ -epi-cadinol dan cis-dihydro- $\alpha$ -copaene-oktanol (19).

### 2.1.5 Habitat dan Penyebaran

Dewandaru berasal dari Brazil Selatan dan Paraguay, selanjutnya tersebar ke daerah Amerika Selatan, Afrika Tengah, India, Sri Lanka, Filipina, Cina Selatan, Amerika Utara dan Eropa (20). Persebaran Dewandaru di Indonesia meliputi daerah Sumatera, Kalimantan, Jawa, Madura, Bali, Nusa Tenggara, dan Sulawesi

(7). Dewandaru tumbuh pada ketinggian 5-600 m dpl, dan sering dibudidayakan sebagai tanaman buah atau tanaman pagar (20).

### **2.1.6 Khasiat Tumbuhan dan Bioaktivitas**

Rebusan air daun Dewandaru berkhasiat untuk mengobati demam, infeksi, diare, anti inflamasi, diabetes, kolesterol dan mengobati tekanan darah tinggi. Rakyat brazil menggunakan hasil infusa, dekok, dan ekstrak alkohol untuk mengobati diare, sakit perut, kolik, infeksi usus, demam, flu, batuk, bronkitis, kecemasan, tekanan darah tinggi dan diabetes (6). Dalam pengobatan sebagai obat mencret diperlukan sekitar  $\pm$  15 gram daun Dewandaru segar, dicuci, dihaluskan, kemudian diseduh dengan 1/2 gelas air matang dan disaring. Hasil saringan ini dapat diminum sehari dua kali sewaktu pagi dan sore hari (17). Dewandaru memiliki beberapa bioaktivitas antara lain antidiabetes, antihipertensi, antivirus, Pada uji bioaktivitas di beberapa penelitian, dilaporkan bahwa ekstrak daun Dewandaru memiliki aktivitas sebagai inhibitor *xanthine oxidase* karena kandungan flavonoid didalamnya. Ekstrak daun Dewandaru juga memiliki aktivitas pada sistem saraf pusat, antiinflamasi, dan antimikroba yang ditujukan untuk pengobatan penyakit usus (16).

## **2.2 Ekstraksi**

### **2.2.1 Pengertian Ekstrak**

Ekstrak adalah sediaan yang kental diperoleh dengan cara mengekstraksi senyawa aktif dari suatu simplisia (nabati atau hewani) menggunakan pelarut yang sesuai. Kemudian dilakukan penguapan terhadap seluruh atau sebagian pelarut, massa yang masih tersisa dapat diuji persyaratannya hingga memenuhi standar ekstrak yang telah ditetapkan. Beberapa ekstrak dibuat dengan cara mengekstraksi bahan baku obat dengan metode perkolasi. Perkolat yang didapat biasanya dipekatkan dengan cara destilasi dan dilakukan pengurangan tekanan, agar bahan semiminal mungkin terkena panas (21).

Ekstrak cair diperoleh dari hasil ekstraksi yang masih mengandung sebagian besar pelarut. Ekstrak kental diperoleh apabila sebagian besar pelarut sudah

diuapkan, sedangkan ekstrak kering akan diperoleh jika sudah tidak mengandung pelarut. Tingtur (*tinctura*) merupakan bentuk sediaan cair yang dibuat dengan metode maserasi atau perkolasi suatu simplisia dengan pelarut yang sesuai pada masing-masing monografi. Kecuali dinyatakan lain, tingtur dibuat dengan menggunakan 20% zat berkhasiat dan 10% untuk zat berkhasiat keras (2).

### **2.2.2 Pengertian Ekstraksi**

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan senyawa dari matriks atau simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Beberapa istilah yang sering digunakan dalam ekstraksi, antara lain ekstrakan (yaitu, pelarut yang digunakan untuk ekstraksi), rafinat (yaitu, larutan senyawa atau bahan yang akan di ekstraksi), dan linarut (yaitu, senyawa atau zat yang diinginkan terlarut dalam rafinat). Tujuan ekstraksi adalah menarik atau memisahkan senyawa dari campurannya atau simplisia (2).

### **2.2.3 Metode Ekstraksi**

Pemilihan metode ekstraksi yang digunakan bergantung pada jenis bahan kimia, dan sifat fisiko kimia kandungan senyawa yang akan disari, mulai dari senyawa yang bersifat non polar hingga polar, sering juga disebut dengan ekstraksi bertingkat. Jenis pelarut yang digunakan mulai dari pelarut non polar seperti heksana, petroleum eter, lalu selanjutnya semi polar seperti kloroform atau diklometana, diikuti pelarut polar seperti alkohol, metanol, dan terakhir apabila diperlukan, digunakan air sebagai pelarut (2). Metode ini sering disebut dengan infusa dan dekokta.

Simplisia yang akan diekstrak dikumpulkan terlebih dahulu dan dibersihkan dari pengotornya dengan cara memilah simplisia pengotor lainnya atau dengan melakukan pencucian. Saat melakukan ekstraksi terhadap simplisia sebaiknya didahulukan menggunakan simplisia yang segar, tetapi jika terdapat keterbatasan umumnya juga bisa dilakukan terhadap bahan yang telah dikeringkan. Selama proses ekstraksi, kerja berbagai enzim yang terdapat dalam simplisia segar akan dihambat. Pada proses pengeringan simplisia terlebih dahulu sebaiknya

dilakukan pencelupan simplisia kedalam metanol mendidih selama beberapa detik agar perubahan senyawa secara enzimatis dapat dicegah atau dikurangi (2).

Pemilihan cara pengeringan yang baik adalah cara yang tidak mengakibatkan terjadinya perubahan metabolit dari simplisia baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Proses pengeringan harus dilakukan secara cepat, untuk metode pengeringan yang tidak menggunakan pengaruh sinar matahari dengan suhu yang tidak terlalu tinggi, seperti menggunakan oven. Salah satu contoh pengeringan paling banyak dilakukan adalah dengan aliran udara. Sebelum melakukan proses ekstraksi, simplisia yang sudah kering dapat disimpan dalam wadah tertutup rapat untuk beberapa waktu saja, karena dalam waktu yang lama juga dapat menyebabkan timbulnya hama/kutu yang dapat merusak kandungan kimia. Pengcilan ukuran sampel atau simplisia perlu diperlukan agar proses ekstraksi berjalan cepat (2).

Banyak metode atau cara ekstraksi yang telah diketahui. Metode tersebut memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing. Dalam pemilihan metode harus memperhatikan beberapa faktor antara lain sifat senyawa, pelarut dan alat yang digunakan. Faktor yang perlu diperhatikan dalam melakukan ekstraksi yaitu struktur untuk setiap senyawa, suhu dan tekanan yang digunakan. Alkohol merupakan salah satu pelarut yang paling banyak dipakai untuk menyari secara menyeluruh. Beberapa metode ekstraksi yang umum digunakan antara lain maserasi, perkolasi, refluks, soxhletasi, infusa, dekok. Penjelasan masing-masing ekstraksi dijelaskan sebagai berikut (2) :

#### A. Maserasi

Maserasi merupakan cara ekstraksi simplisia dengan cara merendam simplisia kedalam pelarut pada suhu kamar sehingga kerusakan atau degradasi metabolit dapat diminimalisasi. Pada maserasi, terjadi proses keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel sehingga diperlukan penggantian pelarut secara berulang. Kinetik adalah cara ekstraksi, seperti maserasi yang dilakukan dengan pengadukan, sedangkan digesti adalah cara maserasi yang dilakukan pada suhu yang lebih tinggi dari suhu kamar, yaitu 40-60°C (2).

## B. Perkolasi

Perkolasi merupakan cara ekstraksi simplisia menggunakan pelarut yang selalu baru, dengan cara mengalirkan pelarut melalui simplisia hingga senyawa tersari sempurna. Cara ini memerlukan waktu yang lebih lama dan pelarut yang lebih banyak. (2).

## C. Refluks

Refluks merupakan cara ekstraksi dengan pelarut pada suhu titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas relatif konstan dengan adanya pendinginan balik. Agar hasil penyarian lebih baik atau sempurna, refluks umumnya dilakukan berulang-ulang (3-6 kali) terhadap residu pertama. Cara ini memungkinkan terjadinya penguraian senyawa yang tidak tahan panas (2).

## D. Sokletasi

Sokletasi merupakan cara ekstraksi menggunakan pelarut organik pada suhu didih dengan alat soklet. Pada sokletasi, simplisia dan ekstrak berada pada labu berbeda. Pemanasan mengakibatkan pelarut menguap, dan uap masuk dalam labu pendingin. Hasil kondensasi jatuh bagian simplisia sehingga ekstraksi berlangsung terus-menerus dengan jumlah pelarut relatif konstan. Ekstraksi ini dikenal sebagai ekstraksi sinambung (2).

## E. Infusa

Infusa merupakan cara ekstraksi dengan menggunakan pelarut air, pada suhu 96-98°C selama 15-20 menit (dihitung setelah suhu 96°C). Bejana infusa tercelup dalam tangas air. Cara ini sesuai untuk simplisia yang bersifat lunak, seperti bunga dan daun (2).

## F. Dekok

Dekok merupakan cara ekstraksi yang mirip dengan infusa, hanya saja waktu ekstraksinya lebih lama yaitu 30 menit dan suhunya mencapai titik didih air (2).

## 2.3 Penguapan

Tujuan dari penguapan hasil ekstraksi yang masih mengandung banyak pelarut, berguna untuk memperoleh ekstrak yang lebih kental agar konsentrasi senyawa yang terkandung lebih besar dan memudahkan dalam penyimpanannya.

Penguapan dapat bersifat parsial sehingga diperoleh ekstrak cair atau kental. Proses tersebut lebih dikenal dengan pemekatan. Penguapan sering dilakukan sebelum ekstrak diproses lebih lanjut, seperti pemisahan atau fraksinasi (2).

Cara sederhana dalam proses pemekatan umumnya menggunakan penangas air. Cara ini mudah dan juga cocok untuk ekstrak dengan pelarut yang memiliki titik didih tidak terlalu tinggi. Penguapan menggunakan penangas air ini memerlukan waktu yang cukup lama sehingga besar kemungkinan akan ada senyawa yang terurai. Penggunaan alat seperti oven pada proses penguapan memiliki kelebihan karena suhu dapat diatur dan disesuaikan dengan titik didih cairan penyari. Oven lebih sering digunakan untuk proses penguapan yang memiliki tidak terlalu banyak kadar cairan. Suhu yang digunakan dalam proses pemekatan sebaiknya tidak terlalu tinggi untuk mencegah peruraian senyawa didalam ekstrak (2).

Pada oven dapat dilengkapi dengan tambahan alat vakum yang akan membuat ruangan didalam oven menjadi hampa sehingga waktu proses penguapan dapat dilakukan lebih cepat daripada oven biasa tanpa alat vakum. Akhir-akhir ini banyak proses penguapan yang menggunakan penguap putar (*rotary evaporator*), ekstrak diuapkan pada suhu rendah sekitar 40-50°C dan dibantu dengan alat vakum udara sehingga titik didih pelarut lebih rendah dan mempercepat penguapan pelarut dengan bantuan sedikit pemanasan sehingga kemungkinan terjadinya penguraian senyawa yang termolabil dapat dihindari (2).

#### **2.4 Uji Fitokimia**

Istilah fitokimia mengacu pada kandungan kimia dalam tumbuhan yang pada dasarnya termasuk dalam kimia bahan alam. Fitokimia semakin berkembang dan mencakup jenis kandungan kimia, struktur kimia, biosintesis, penyebaran dan efek farmakologi dari bahan alam. Perkembangan fitokimia didukung dengan makin maraknya penelitian, publikasi dan gerakan *back to nature* atau kembali ke alam. Identifikasi dan penetapan kadar kandungan senyawa dalam tumbuhan selalu dimulai dengan proses ekstraksi. Ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan (2).

Kajian fitokimia meliputi isolasi yang sering diikuti dengan penggolongan, bahkan sampai pada penentuan struktur kimia, jenis senyawa kimia hingga kadarnya. Selama berabad-abad, tumbuhan sering digunakan dalam pengobatan, meskipun hanya berdasarkan bukti empiris. Pemanfaatan ini didukung dengan makin berkembangnya disiplin ilmu kedokteran yang mulai memberikan perhatian pada tanaman obat dan/atau obat herbal. Selain mengandung air tumbuhan juga mengandung senyawa kimia lain yang kebanyakan terdiri dari senyawa anorganik dan organik (merupakan metabolit primer dan sekunder). Kedua senyawa tersebut memiliki fungsi yang berbeda (2).

Metabolit primer memiliki peran penting dalam kehidupan organisme penghasil, sedangkan peran metabolit sekunder tidak terlalu penting. Kandungan air di dalam berbagai bagian tanaman berbeda. Pada buah dan daun, kandungan air cukup besar, sedangkan pada biji dan kulit kayu tidak cukup besar kandungan airnya. Sesuai dengan perkembangan peradaban, ilmu pengetahuan, dan teknologi, pemanfaatan bahan alam makin meningkat dalam berbagai bidang antara lain kesehatan, makanan-minuman, lingkungan dan industri. Banyak di antaranya dapat memberikan nilai ekonomi yang cukup tinggi, seperti tanaman pertanian dan bahan baku obat (2).

## **2.5 Toksisitas**

Istilah “Toksisitas” didefinisikan sebagai kapasitas bawaan dari bahan kimia yang menyebabkan terjadinya cedera (berkaitan dengan dosis dan durasi paparan). Dengan demikian semua bahan kimia termasuk obat-obatan memiliki tingkat toksisitas. Toksikologi berusaha untuk mengkaraktisasi efek yang berpotensi merugikan bagi makhluk hidup dan hubungan dosis-respon untuk melindungi kesehatan masyarakat. Toksikologi didefinisikan sebagai studi tentang efek merugikan bahan kimia pada organisme hidup. “Semua obat adalah racun”, sebagaimana yang dikatakan oleh dokter Paracelsus (1493-1541). Tidak ada yang bukan racun. Dosis yang tepat membedakan obat dengan racun (22).

Secara umum semua metode pengujian toksisitas dapat dibagi menjadi 2 kategori. Kategori pertama merupakan toksisitas umum terdiri dari tes yang

dirancang untuk mengevaluasi efek keseluruhan senyawa pada hewan percobaan, dan yang membedakannya hanya durasi. Jenis pengujian toksisitas yang masuk kedalam kategori ini adalah toksisitas akut, toksisitas jangka panjang, toksisitas kronis dan toksisitas sub kronis. Kategori kedua merupakan toksisitas khusus, terdiri dari tes yang dirancang untuk mengevaluasi secara rinci jenis toksisitas tertentu. Uji toksisitas kronis dan toksisitas jangka panjang tidak dapat mendeteksi semua bentuk toksisitas, namun dapat mengungkapkan beberapa toksisitas spesifik. Jenis pengujian toksisitas yang masuk kedalam kategori ini adalah :

1. Teratogenik , yaitu tes yang menunjukkan efek pada janin
2. Tes Reproduksi, yaitu tes untuk menentukan efek pada kapasitas reproduksi hewan
3. Mutagenik, yaitu tes untuk menentukan efek pada sistem kode genetik
4. Karsinogenetik dan Tumorgenetik , yaitu tes untuk menentukan kemampuan agen untuk menghasilkan tumor,
5. Tes untuk menentukan efek lokal pada kulit dan mata
6. Tes untuk menentukan efek agen pada pola perilaku hewan
7. Imunotoksitas , yaitu tes untuk menentukan efek pada sistem kekebalan tubuh (23).

### **2.5.1 Target Organ**

Bahan kimia beracun dapat berkontak pada kulit, terhirup oleh hidung, maupun tertelan. Bahan kimia eksogen ini akan terdistribusi ke bagian organ, dimana zat ini dapat dimetabolisme menjadi produk dimana ketoksikannya dapat berkurang. Senyawa induk atau metabolitnya dapat berinteraksi ke bagian makromolekul target dan menghasilkan efek toksik (22).

Setiap jaringan atau organ berpotensi terkena dampak racun dari bahan kimia. Paru-paru, hati, dan jaringan dengan aliran darah yang tinggi seperti otak dan ginjal sangat rentan terhadap aksi toksik bahan kimia. Selain itu, jantung sensitif terhadap gangguan apapun yang diinduksi toksin dalam gradien ionik. Terdapat aksi selektif dan non selektif dalam mekanisme toksik oleh bahan kimia. Aksi non

selektif umumnya hanya terjadi dilokasi paparan, sedangkan aksi selektif muncul bila hanya bahan kimia telah diserap dan didistribusikan didalam tubuh (22).

### 2.5.2 Ketentuan Umum Uji Toksisitas

Hasil pengujian toksisitas sangat bergantung pada sifat dari zat yang diuji. Bentuk sediaan uji yang digunakan berupa zat yang dapat larut atau tersuspensi dalam air atau dapat larut dalam minyak, yang dapat berasal dari tanaman, hewan maupun hasil sintesis organik (24).

Beberapa informasi yang diperlukan untuk sediaan uji yang berupa zat kimia antara lain, identitas zat kimia, sifat fisiko- kimia, kemurnian zat kimia dan kadar cemaran logam berat. Sedangkan beberapa informasi yang diperlukan untuk sediaan uji yang berupa simplisia tanaman obat antara lain, nama latin dan nama daerah tumbuhan, deskripsi daerah asal tumbuhan, bagian tanaman yang digunakan, pemerian simplisia, pembuatan dan cara penanganan simplisia, dan kandungan kimia dalam simplisia (24).

Sediaan uji dapat dibuat dengan beberapa cara, sesuai dengan sifat dan cara pemberiannya. Sediaan uji yang dapat dibuat berupa:

1. Formulasi bentuk sediaan cair
  - a. Sediaan uji harus dibuat dalam bentuk larutan dalam air bila sediaan uji larut dalam air
  - b. Sediaan uji dibuat dalam bentuk suspensi menggunakan pensuspensi gom arab dengan konsentrasi 3 - 5%, pensuspensi CMC (carboxy methyl cellulose) dengan konsentrasi 0,3 – 1,0% atau dengan zat pensuspensi lain yang inert secara farmakologi, bila sediaan uji tidak larut dalam air.
  - c. Sediaan uji dilarutkan dalam minyak, misalnya minyak zaitun atau minyak jagung, bila tidak dapat dilakukan dengan cara – cara yang telah disebutkan diatas (24).

2. Campuran pada makanan

Pada pengujian toksisitas subkronis dengan pemberian berulang, sebagai pertimbangan dalam hal kepraktisan, sediaan uji ini dapat diberikan dengan cara mencampur bahan ke dalam dalam makanan atau minuman hewan percobaan.

Dosis yang diberikan harus tetap, bergantung pada berat badan dan perhitungan jumlah makanan dan minuman yang dikonsumsi setiap hari (24).

### 3. Sediaan uji untuk simplisia tanaman obat

Dalam membuat sediaan uji simplisia tanaman obat prosesnya sama seperti penggunaan pada manusia atau cara lain yang sesuai, misalnya dengan cara ekstraksi dengan pelarut etanol. Ekstraksi menggunakan air (infusa dan dekokta) juga dapat dilakukan dengan cara diseduh, direbus selama dapat menjamin terekstraknya kandungan kimia didalam simplisia secara sempurna. Pada proses pemekatan guna mencapai dosis yang diinginkan, maka suhu pemanasan tidak boleh tinggi yang dapat menyebabkan berkurangnya kandungan zat berkhasiat. Untuk simplisia yang mengandung minyak atsiri, proses penyiapan dan pemekatan sediaan uji dilakukan dalam wadah tertutup(24). Ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol dapat dilakukan dengan cara dingin, misalnya maserasi, perkolasi, atau dengan cara panas misalnya direbus, disokletasi, direfluks dan selanjutnya disaring. Penguapan dilakukan untuk menghilangkan etanol, dan sisa penguapan tersebut dilarutkan ke dalam air (untuk zat yang larut air) atau disuspensikan (untuk zat yang tidak larut air) menggunakan tragakan 1-2%, CMC 0,3 – 1,0 % (sesuai kebutuhan), atau bahan pensuspensi lain yang sesuai (24).

#### 2.5.3 Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas merupakan suatu pengujian yang bertujuan untuk melihat efek toksik suatu zat pada sistem biologi tubuh dan untuk memperoleh data dosis-respon yang khas pada suatu sediaan uji. Data ini dapat digunakan sebagai informasi mengenai derajat bahaya dari sediaan uji bila zat ini terpapar pada tubuh manusia, sehingga dosis penggunaannya dapat ditentukan demi keamanan manusia (25).

Beberapa komponen bahan obat herbal seperti asam aristolochic, alkaloid pirolizidin, dan alkaloid efedrin terkait dengan terjadinya nefropati, penyakit vena oklusif hepatic, serangan jantung dan stroke. Karena itu perlu diketahui pada suatu obat herbal mengandung komponen yang berpotensi beracun atau tidak.

Bersamaan dengan identifikasi bahan kimia, tes toksisitas akut hingga kronis perlu diteliti. Penilaian toksisitas dari obat herbal harus mengikuti pedoman internasional yang terotoritas dan kompeten. Misalnya OECD, UE (*European Union*), ICH (*International Conference on Harmonization*), atau WHO (*World Health Organization*) (26).

Klasifikasi suatu zat dilakukan atas dasar nilai LD<sub>50</sub> (*Letal Dose*) . Nilai ini didefinisikan sebagai "dosis tunggal zat yang diharapkan menyebabkan kematian pada 50% dari hewan dalam kelompok eksperimental"(27). Konsep LD<sub>50</sub> pertama kali diperkenalkan pada tahun 1927 untuk melihat sifat toksik dari senyawa aktif biologis seperti digoxin. Sejak akhir dari 1970, pengujian LD<sub>50</sub> telah banyak dikritik atas *animal welfare*, dan oleh sebab itu beberapa prosedur tes telah dimodifikasi dalam berbagai cara untuk mengurangi jumlah hewan yang diperlukan, dan untuk mengurangi penderitaan yang dirasakan untuk setiap hewan percobaan. Beberapa uji modifikasi pengujian LD<sub>50</sub> antara lain *Fixed Dosed Procedure* ( OECD 420), *Acute Toxic Class Method* (OECD 423) dan *Up and Down Procedure* (OECD 425) (27).

Pengujian toksisitas menggunakan hewan percobaan sebagai gambaran bertujuan untuk melihat adanya reaksi biokimia, secara fisiologi dan patologi pada manusia terhadap suatu sediaan uji. Hasil dari pengujian toksisitas ini tidak dapat digunakan sebagai dasar untuk membuktikan keamanan suatu bahan/ sediaan pada manusia, namun pengujian ini dapat memberikan petunjuk adanya toksisitas relatif dan dapat membantu mengidentifikasi efek toksik bila terjadi pemaparan pada tubuh manusia. Beberapa faktor yang dapat menentukan hasil dari pengujian toksisitas secara *in vivo* adalah: pemilihan jenis spesies hewan percobaan, galur dan jumlah hewan percobaan, cara pemberian sediaan uji, pemilihan dan perhiungan dosis, efek samping sediaan uji, teknik dan prosedur pengujian termasuk cara penanganan hewan selama percobaan (25).

Tabel 1. Tanda toksik pada organ atau sistem (28).

Sistem	Tanda Toksik
Autonomik	Membran niktians melemas, eksoftalmos, hipersekresi hidung, salivasi, diare, piloereksi
Perilaku	Sedasi, gelisah, posisi kepala keatas, kepala tertunduk, depresi berat, sering menjilat tubuh, kuku mencakar, terengah-engah, aktivitas yang aneh
Sensorik	Peka terhadap nyeri, refleks kornea, refleks tungkai belakang, peka terhadap bunyi dan sentuhan
Neuromuskuler	Tremor, konvulsi, ataksia, lemas, ekos melengkung keatas membentuk huruf S, refleks tungkai belakang hilang atau berkurang, kematian
Pernafasan mata	Hipopnea, dispnea, terengah-engah, miosis, lakrimasi, nistagmus, refleks pupil
Gastrointestinal, gastrourinary	Salivasi, berdahak, diaere, berak atau kencing berdarah, konstipasi, muntah
Kulit	Piloereksi, menggigil, eritema, edema, nekrosis, bengkak

Sebagian besar penelitian toksisitas akut dengan menentukan dosis letal median atau disingkat LD<sub>50</sub> yaitu dosis tunggal suatu zat yang dapat membunuh 50% hewan percobaan (25). Tujuan pengujian toksisitas akut ini adalah untuk mendeteksi toksisitas intrinsik suatu zat, menemukan organ sasaran dan kepekaan spesies, memperoleh informasi bahaya setelah pemaparan suatu senyawa (29), memperoleh informasi untuk perbandingan toksisitas dan dosis-respon, sebagai bahan untuk menstandarisasi produk biologis tertentu seperti vaksin (30), memberikan perkiraan kuantitatif nilai LD<sub>50</sub> untuk dibandingkan dengan zat lain, mengidentifikasi organ target dan manifestasi klinis dari toksisitas akut, menetapkan reversibilitas toksisitas akut, dan dapat memberikan pedoman pemberian dosis untuk studi lain (15). Tetapi untuk beberapa zat yang bila kondisi

toksisitas akutnya rendah, kadang kita tidak perlu menentukan LD<sub>50</sub>. Suatu nilai perkiraan sudah dapat memberikan manfaat. Misalnya, kita meneliti zat pewarna makanan yang diberikan kepada beberapa tikus dengan dosis 2 g/kg. Jika tidak ada tikus yang mati, maka dianggap toksisitas akut dapat disingkirkan dan nilai LD<sub>50</sub> tidak perlu ditentukan. Pandangan ini diterima oleh Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Untuk jenis zat yang terjadi melalui inhalasi, maka yang harus ditentukan adalah kadar letal median atau disingkat dengan LC<sub>50</sub> (25).

Dalam penentuan LD<sub>50</sub> hewan percobaan yang digunakan adalah tikus dan mencit. Alasan pemilihan hewan percobaan ini karena mudah didapat, harganya yang terjangkau, dan mudah dalam penanganannya. Selain itu, terdapat banyak data toksikologi tentang jenis hewan ini (25). Studi ini dilakukan pada hewan jantan dan betina dewasa. Jumlah hewan yang mati dalam waktu 14 hari kemudian ditabulasi. Selain kematian dan berat badan, pemeriksaan harian hewan percobaan harus dilakukan untuk melihat tanda-tanda keracunan, kelesuan, modifikasi perilaku, morbiditas, konsumsi makan, dan sebagainya (15).

Jumlah hewan yang mati dan waktu kematiannya diamati untuk memperkirakan nilai LD<sub>50</sub>. Pengamatan untuk melihat tanda-tanda keracunan harus dilakukan pada semua hewan yang mati dan pada beberapa hewan yang hidup, terutama hewan yang tampak sakit pada akhir percobaan. Pengamatan ini dapat memberikan informasi tentang organ sasaran yang dituju, terutama bila kematian tidak terjadi segera setelah pemberian zat uji. Mungkin juga diperlukan pemeriksaan histopatologik organ tubuh dan jaringan tertentu (25). Rute pemberian obat biasanya melalui jalur yang biasa digunakan pada manusia. Jalur oral paling sering digunakan. Bila akan diberikan per oral, zat tersebut harus diberikan dengan sonde. Jalur parenteral juga dapat dipakai untuk menilai toksisitas akut obat parenteral. Di samping itu, jenis pemberian injeksi intravena dan intraperitoneal juga dipakai bersamaan dengan LD<sub>50</sub> oral dan dermal untuk menilai laju dan luasnya penyerapan obat melalui jalur oral dan dermal (25).

Untuk menentukan nilai LD<sub>50</sub> secara tepat, kita perlu memilih suatu dosis yang akan membunuh sekitar separuh dari jumlah hewan percobaan, kemudian memilih dosis kedua yang akan membunuh lebih dari separuh (kalau bisa kurang

dari 90%), dan memilih dosis ketiga yang akan membunuh kurang dari separuh (kalau bisa lebih dari 10%) dari jumlah hewan percobaan. Sering digunakan empat dosis atau lebih dengan harapan bahwa sekurang-kurangnya tiga diantaranya akan berada dalam rentang dosis yang kita dikehendaki. Secara umum, LD<sub>50</sub> akan lebih tepat bila digunakan lebih banyak hewan untuk tiap dosis dan bila rasio antara dosis yang berurutan lebih kecil. Banyak peneliti menggunakan 40-50 hewan dan memilih rasio 1,2-1,5. Namun, peneliti lain misalnya disarankan penggunaan empat hewan untuk tiap dosis dengan menggunakan rasio sebesar 2,0 antara dosis yang berurutan. Belakangan ini diajukan prosedur uji sederhana yang lain yang menggunakan hanya enam sampai sembilan hewan untuk setiap uji (25).

Terdapat faktor yang dapat mempengaruhi nilai LD<sub>50</sub> antara lain strain hewan, usia dan berat badan, jenis pakan SPIR, waktu puasa, metode administrasi, volume administrasi, jenis media pensuspensi, durasi pengamatan (15), jenis kandang, jenis bahan alas kandang, suhu lingkungan, dan tingginya kelembapan relatif yang dapat meningkatkan toksisitas akut, sehingga nilai LD<sub>50</sub> yang didapatkan akan lebih rendah (25).

Evaluasi hasil pengujian toksisitas akut dapat dilakukan berdasarkan kriteria bahaya dari GHS yang dijelaskan dalam *Thirteenth Addendum to The OECD Guidelines for The Testing of Chemicals* (2001). Penentuan kriteria penggolongan toksisitas berdasarkan GHS dalam OECD dijelaskan pada Tabel 3.

Tabel 2. Klasifikasi toksisitas menurut Lu,dkk (28).

Tingkat Toksisitas	LD <sub>50</sub> oral	Klasifikasi
1	≤ 1 mg/kg	Sangat toksik
2	1-50 mg/kg	Tidak toksik
3	50-500 mg/kg	Toksik sedang
4	500-5000 mg/kg	Toksik ringan
5	5-15 g/kg	Praktis tidak toksik
6	≥15 g/kg	Relatif tidak membahayakan

Tabel 3. Kriteria penggolongan sediaan uji menurut OECD 420 (31) (32).

Dosis (mg/kg)	Kematian	Kategori
5	$\geq 2$ dari 5 ekor mati	1 ( <i>highly toxic</i> )
5	$\geq 1$ ekor menunjukkan gejala toksisitas dan tidak ada kematian	2 ( <i>extremely toxic</i> )
50	$\geq 2$ dari 5 ekor mati	
50	$\geq 1$ ekor menunjukkan gejala toksisitas dan tidak ada kematian	3 ( <i>moderately toxic</i> )
300	$\geq 2$ dari 5 ekor mati	
300	$\geq 1$ ekor menunjukkan gejala toksisitas dan tidak ada kematian	4 ( <i>moderately toxic</i> )
2000	$\geq 2$ dari 5 ekor mati	
2000	$\geq 1$ ekor menunjukkan gejala toksisitas dan tidak ada kematian	5 ( <i>low toxicity</i> )
5000	Tidak ada kematian	Unclassified

### 2.5.3.1 Metode Uji Toksisitas Akut

Penentuan toksisitas akut awalnya difokuskan pada penentuan nilai LD<sub>50</sub> (dosis yang dapat membunuh setengah dari hewan percobaan) setelah mengamati timbulnya sifat, keparahan, dan reversibilitas toksisitas. Konsep LD<sub>50</sub> pertama kali dikembangkan oleh Trevan pada tahun 1972, diperlukan data minimal tiga dosis, hasil nilai LD<sub>50</sub> disajikan sebagai perkiraan dosis mg/kg dengan batas kepercayaan. Terdapat beberapa kritik dari tes LD<sub>50</sub> ini antara lain hanya mencerminkan kematian saja, tidak mengekspresikan akut lainnya, diperlukan sejumlah besar hewan coba untuk uji statistik agar nilai dapat diterima, nilai LD<sub>50</sub> jarang mirip karena terdapat faktor seperti spesies, strain, jenis kelamin, dan usia. Namun pengujian ini tetap perlu dilakukan dengan cara perlakuan yang benar,

tidak hanya menghasilkan nilai LD<sub>50</sub>, namun perlu juga menghasilkan efek akut lainnya seperti penyebab kematian, waktu kematian, simptomatologi, efek akut yang tidak mematikan, organ yang terkena, dan reversibilitas efek yang tidak mematikan (30).

Pengujian toksisitas akut menggunakan metode konvensional mempunyai kelemahan yaitu hewan percobaan yang dibutuhkan cukup banyak, bertentangan dengan kesejahteraan hewan. Oleh sebab itu, pada tahun 1984 dibuat metode alternatif dimana hewan yang digunakan jumlahnya lebih sedikit yaitu metode *Up and Down Procedure*, *Fixed Dose Method* dan *Toxic Class Method* (24).

Metode alternatif yang digunakan merupakan revisi dari metode OECD tahun 1984 dikarenakan adanya kesepakatan untuk mendapatkan cara yang lebih efektif dalam mengklasifikasikan suatu bahan kimia. Pada metode alternatif ini, hanya menggunakan satu jenis kelamin hewan percobaan. Menurut metode ini umumnya jenis kelamin betina lebih sensitive pada pengujian. Maka pada uji alternatif hanya menggunakan hewan betina. Jumlah hewan yang digunakan pada uji alternatif lebih sedikit dibandingkan dengan metode konvensional (24).

Pedoman yang paling diterima secara universal adalah pedoman yang diterbitkan oleh Organisasi OECD dan diterima di banyak negara. Pedoman ini dikembangkan untuk penggunaan internasional dan dianggap memadai untuk evaluasi sebagian besar bahan kimia. Draf awal dikeluarkan pada tahun 1979 oleh negara-negara utama (A.S. dan A.K.) kemudian ditinjau dan diperbarui secara berkala (33).

Tabel 4. Pedoman OECD untuk studi toksisitas (33)

Durasi	Pedoman	Tanggal pengeluaran	Judul
Akut	401	2/24/87	Toksisitas Akut Oral
	402	2/24/87	Toksisitas Akut Dermal
	420	7/17/92	Toksisitas Akut Oral - <i>Fixed Dose Method</i>
	423	3/22/96	Toksisitas Akut Oral - <i>Acute Toxic Class Method</i>

Durasi	Pedoman	Tanggal pengeluaran	Judul
	425	9/21/98	Toksisitas Akut Oral - <i>Up and Down Procedure</i>
Subkronik	407	7/27/95	<i>Repeated Dose 28 Day Oral Toxicity Study in Rodents</i>
	408	9/21/98	<i>Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents</i>
	409	9/21/98	<i>Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in non Rodents</i>
	410	05/12/81	<i>Repeated Dose Dermal Toxicity : 21/28 Day Study</i>
	411	05/12/81	<i>Subchronic Dermal Toxicity : 90-Day Study</i>
Kronik	452	05/12/81	<i>Chronic Toxicity Studies</i>
	453	05/12/81	<i>Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies</i>

#### A. Metode Konvensional

Minimal diperlukan 3 rentang dosis untuk memperoleh suatu kurva dosis-respon (menghitung nilai  $LD_{50}$ ). Pengamatan dilakukan tiap hari selama sekurang-kurangnya 14 hari terhadap sistem kardiovaskuler, pernafasan, somatomotor, kulit dan bulu, mukosa, mata dsb. Data diringkas dalam bentuk tabel yang menunjukkan:

1. Dosis uji yang digunakan
2. Jumlah hewan yang menunjukkan gejala toksisitas
3. Jumlah hewan yang ditemukan mati selama uji dan yang mati karena sekarat (keadaan *moribound*).

Nilai  $LD_{50}$  dihitung dengan perhitungan metode Thompson & Weil, Litchfield & Wilcoxon, Miller & Tainter, regresi linear/probit atau metode statistik lainnya. Semua hewan yang mati, baik yang mati dengan sendirinya atau

yang mati dalam keadaan moribound digabungkan jumlahnya untuk penghitungan nilai LD<sub>50</sub> (24).

Metode yang digunakan untuk menentukan nilai LD<sub>50</sub>, antara lain :

a. Menurut Farmakope Indonesia III

$$m = a - b (\sum pi - 0,5)$$

Keterangan : (21)

$m$  = log nilai dari LD<sub>50</sub>

$a$  = logaritma dosis terendah yang menyebabkan kematian 100% masing-masing kelompok

$b$  = beda logaritma dosis yang berurutan

$pi$  = jumlah hewan yang mati setelah diberikan dosis  $i$ , dibagi dengan jumlah hewan seluruhnya yang menerima dosis  $i$ .

Syarat yang harus dipenuhi untuk penggunaan metode Farmakope Indonesia :

1. Perlakuan harus menggunakan seri dosis dengan pengenceran yang berkelipatan tetap
2. Jumlah hewan percobaan harus sama banyak pada masing-masing kelompok, dan dosis diatur sedemikian rupa dengan uji pendahuluan terlebih dahulu, sehingga dosis yang dipakai yang memberikan efek dari 0% sampai 100% (21).

b. Metode Weil, CS

LD<sub>50</sub> dihitung dengan rumus (34) :

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

Keterangan :

$m$  = harga LD<sub>50</sub>

$D$  = dosis terkecil yang digunakan

$d$  = log r (kelipatan dosis)

$f$  = faktor

### c. Metode Grafik Probit

Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Miller dan Tainter dengan menggunakan tabel probit dan kertas probit (kertas grafik persen vs probit). Perhitungan nilai LD<sub>50</sub> atau LD<sub>9</sub> dengan melihat respon kematian hewan percobaan pada uji toksisitas kurang dari 16% atau lebih dari 84%. Hasil % respon efek yang muncul kemudian dihubungkan dengan dosis yang dipakai dalam skala logaritma, hasil ini akan memperoleh kurva berbentuk *sigmoid*. Bagian yang relatif tidak lurus selanjutnya dapat diluruskan dengan cara memprobitkan (35).

### B. Metode OECD

#### 1. *Fixed Dose Method*

Hewan percobaan jenis kelamin betina diberikan tingkatan dosis berdasarkan *fixed doses method* antara lain: 5, 50, 300 dan 2000 mg/kg (penambahan dosis maksimum 5000 mg/kg) untuk memastikan nilai LD<sub>50</sub> >5000 mg/kg. Pemilihan dosis awal berdasarkan pengujian pendahuluan sebagai dosis yang dapat menimbulkan gejala toksisitas ringan tetapi tidak menimbulkan efek toksik yang berat atau kematian. Prosedur ini kemudian dilanjutkan hingga mencapai dosis yang menimbulkan efek toksik atau ditemukan tidak lebih dari 1 kematian, atau tidak tampak efek toksik hingga dosis yang tertinggi atau adanya kematian pada dosis yang lebih rendah (24).

#### 2. *Acute Toxic Class Method*

Alasan utama dikembangkannya metode ini adalah untuk melihat aspek kesejahteraan hewan bersamaan dengan perlindungan kesehatan manusia yang harus dibuat dengan cara yang sama bahkan harus lebih baik dari uji LD<sub>50</sub> konvensional (36). Metode kelas (ATC) dikembangkan sebagai alternatif untuk tes LD/LC<sub>50</sub>. Pada prinsipnya, alternatif untuk pengujian *in vivo* harus menggunakan dan metode *in vitro*. Namun, tidak ada tes *in vitro* yang divalidasi untuk penilaian toksisitas akut. Oleh karena itu, metode pengujian hewan harus dirancang dengan menggunakan hewan paling sedikit mungkin. Metode ATC menggunakan maksimum 6 hewan percobaan per dosis/konsentrasi. Hasilnya

(jumlah hewan yang mati) akan menentukan apakah pengujian lebih lanjut diperlukan atau pengujian dihentikan. Seperti tes sebelumnya, dasar biometrik dari metode ATC adalah model Probit. Metode ATC sudah menjadi Pedoman Uji resmi OECD dan UE secara luas digunakan oleh beberapa Negara (37).

Jumlah hewan percobaan yang digunakan pada prinsipnya lebih sedikit yaitu tiga hewan percobaan. Prosedur ini bertujuan untuk mengidentifikasi dosis terendah yang menyebabkan dua atau tiga hewan untuk mati. Jika dua atau tiga hewan mati, pengujian ulang dilakukan pada tingkat yang lebih rendah. Ketika kurang dari dua hewan yang mati, maka tes diulang pada tingkat yang sama. Jika dua atau tiga hewan mati dalam langkah ini, tes diulang pada tingkat yang lebih rendah, dan jika kurang dari dua yang mati, tes diulang pada tingkat yang lebih tinggi (38).

Ketika pengujian 5000 mg/kg diperlukan hanya dilakukan satu langkah (3 hewan). Jika hewan pertama mati, maka selanjutnya mengikuti prosedur 2000 mg/kg sesuai pada annex 2. Jika hewan pertama bertahan, dua hewan lagi diberi dosis. Jika hanya satu dari tiga hewan yang mati, maka nilai  $LD_{50}$  melebihi 5000 mg/kg (39).

### 3. *Up and Down Procedure*

Merupakan metode pengujian toksisitas akut yang bertahap dengan menggunakan hewan tunggal. Hewan pertama menerima dosis tepat dibawah perkiraan nilai  $LD_{50}$ . Penentuan untuk dosis berikutnya mengikuti faktor 3,2 berdasarkan status dosis sebelumnya setelah 24 jam. Jika hewan percobaan mati, maka dosis selajutnya diturunkan dengan penurunan faktor 3,2. Jika hewan percobaan hidup maka dosis selanjutnya dinaikkan dengan penurunan faktor 3,2. Urutan ini terus sampai ada pembalikan hasil awal yaitu titik dimana peningkatan dosis mengakibatkan kematian daripada bertahan hidup, atau menurunkan dosis hasil dari kelangsungan hidup daripada kematian) kemudian, hewan tambahan mengikuti prinsip up-down sampai kriteria berhenti terpenuhi. Jika tidak ada pembalikan sebelum mencapai batas atas dosis yang dipilih (2000 atau 5000 mg/kg), maka gunakan jumlah hewan tertentu di dosis batas (40).

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2019 - Maret 2020 di Laboratorium Sentral, Laboratorium Kimia Analisis, dan Laboratorium Farmakologi Farmasi Universitas Andalas - Padang.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Timbangan analitik (Ohaus<sup>®</sup>), *Rotary evaporator* (Buchi<sup>®</sup>), Gelas ukur (Pyrex<sup>®</sup>), Hot plate (Arec<sup>®</sup>), Furnace (Carbolite Gero<sup>®</sup>), Oven (Mettler<sup>®</sup>) Timbangan hewan (Taffware<sup>®</sup>), Desikator, Botol reagen gelap, Grinder, Corong, Alat bedah (gunting dan pinset), Lumpang dan alu, Alat destilasi, Tabung reaksi, Sonde, *Stopwatch*, Kaca arloji

##### 3.2.2 Bahan

Daun Dewandaru, etanol 70% (Brataco<sup>®</sup>), Na CMC 0,5%, aquadest, reagen fitokimia, makanan standar mencit, kertas saring, aluminium foil, plat KLT Silica gel F<sub>254</sub>.

##### 3.2.3 Hewan

Mencit putih betina yang sehat, tidak dalam keadaan hamil, dan belum pernah digunakan (naif), berumur 8-12 minggu (39), dengan berat badan 20-30 g sebanyak 18 ekor. Sebelum penelitian dilakukan, terlebih dahulu mencit diaklimatisasi selama 5 hari (39). Banyaknya kelompok yang digunakan sebanyak 6 kelompok, masing-masing terdiri dari 3 hewan dan untuk kelompok uji berdasarkan skema OECD 423. Kelompok uji diberikan ekstrak daun Dewandaru dengan dosis 300 mg/kg dan 2000 mg/kg yang dibagi kedalam 2 tahap, kemudian dosis 5000 mg/kg. 1 kelompok kontrol negatif diberikan Na CMC 0,5%.

### **3.3 Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1 Pengambilan Sampel**

Daun Dewandaru diambil di Nagari Kambang Timur, Kecamatan Lengayang, Pesisir Selatan, Sumatera Barat.

#### **3.3.2 Identifikasi Tanaman**

Identifikasi tanaman dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Andalas Padang.

#### **3.3.3 Penyiapan Simplisia**

Sampel daun Dewandaru segar sebanyak 4 kg disortasi dan dibersihkan dari pengotor, kemudian dikering anginkan dibawah rumah kaca selama 7 hari. Setelah sampel kering, dengan ketentuan sampel dapat diremukkan, sampel kering tersebut dirajang dan ditimbang.

#### **3.3.4 Pembuatan ekstrak daun Dewandaru**

1 bagian sampel yang sudah dirajang dan 10 bagian pelarut (etanol 70%) dimasukkan kedalam wadah botol yang bewarna gelap sebagai wadah maserasi, perendaman pertama dilakukan selama 6 jam sambil sesekali di aduk. Selanjutnya dibiarkan hingga 18 jam dan filtratnya disaring, lalu ampasnya dimaserasi kembali dengan etanol 70 % (41). Maserat yang sudah didapatkan kemudian dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.

#### **3.3.5 Karakteristik Ekstrak**

##### **3.3.5.1 Uji Organoleptis**

Ekstrak yang diperoleh diuji secara organoleptis dengan menggunakan pengamatan panca indera untuk mendeskripsikan bentuk, warna, rasa, dan bau, dari ekstrak (42).

### 3.3.5.2 Penentuan Rendemen

Daun Dewandaru yang telah dibersihkan kemudian ditimbang dan didapatkan massa (A), ekstrak yang diperoleh ditimbang kembali dan didapatkan massa (B). Perhitungan rendemen dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{B}{A} \times 100 \% \quad (42).$$

### 3.3.5.3 Penentuan Susut Pengeringan

Keringkan cawan kosong kedalam oven pada suhu 105° C selama 30 menit, kemudian cawan tersebut masukkan kedalam desikator dan berat awal cawan ditimbang dinyatakan sebagai massa (W0). Selanjutnya dilakukan penimbangan ekstrak sebanyak 2 gram dan dimasukkan kedalam cawan dan ditimbang kembali dinyatakan sebagai massa (W1). Ekstrak diratakan dengan menggoyangkan cawan dan masukkan cawan yang telah berisi ekstrak kedalam oven. Lakukan pemanasan pada suhu 105° C hingga didapatkannya bobot yang konstan (42). Setelah pemanasan masukkan cawan ke dalam desikator. Timbang kembali berat cawan dan dinyatakan sebagai massa (W2). Perhitungan susut pengeringan menggunakan rumus:

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

Keterangan :

W0 = berat cawan kosong

W1 = berat cawan + ekstrak

W2 = berat cawan + hasil pengeringan

### 3.3.5.4 Penetapan Kadar Abu Total

Pijarkan kurs kemudian timbang 2 g ekstrak daun dan masukkan ke dalam kurs yang telah dipijarkan. Pemijaran dilakukan pada suhu tinggi kemudian setelah menjadi abu masukkan kedalam desikator dan tunggu hingga dingin pada suhu kamar, kemudian timbang. Hitung kadar abu total terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (42).

Perhitungan kadar abu total :

$$\text{Kadar Abu Total} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

Keterangan :

W0 = berat kurs kosong

W1 = berat kurs + ekstrak

W2 = berat kurs + hasil pemijaran

### 3.3.5.5 Pemeriksaan Kandungan Kimia (KLT)

Larutan uji KLT : timbang seksama lebih kurang 1 g serbuk simplisia, rendam sambil dikocok diatas penangas air dengan 10 mL pelarut yang sesuai selama 10 menit. Masukkan filtrat kedalam labu terukur 10 mL, tambahkan pelarut sampai tanda batas. Larutan pembanding : timbang 1 mg serbuk asam galat murni kemudian larutkan dengan 1 mL metanol pro analisa.

Buat larutan pengembang sebagai fase gerak metanol : etil asetat (9:1) kedalam bejana kromatografi. Tempatkan kertas saring ke dalam bejana kromatografi untuk penjenuhan bejana, tutup kedap dan biarkan kertas saring basah seluruhnya. Totolkan larutan uji (ekstrak) dan larutan pembanding (asam galat murni) pada lempeng KLT dengan menggunakan pipet mikro, dengan jarak antara 0,5 cm dari tepi bawah lempeng, beri tanda dan biarkan mengering. Tempatkan lempeng KLT dalam bejana kromatografi, biarkan fase gerak naik hingga fase gerak merambat sampai batas jarak rambat. Keluarkan lempeng, keringkan di udara, dan amati bercak dibawah lampu UV 365 nm. Tentukan harga R<sub>f</sub>, dan bandingkan kromatogram zat uji dengan kromatogram pembanding (41).

### 3.3.5.6 Uji Fitokimia

#### 1. Alkaloid

Sebanyak 0.1 gram ekstrak daun Dewandaru ditambahkan dengan 10 mL kloroform dan beberapa tetes amonia. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan beberapa tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Fraksi asam diambil dan dibagi menjadi 3 tabung, kemudian ditambahkan pereaksi Dragendorf, Meyer, dan Wagner.

Terbentuknya endapan putih pada pereaksi Meyer, endapan merah pada pereaksi Dragendorf, dan endapan coklat pada endapan pereaksi Wagner menunjukkan adanya alkaloid (43).

## 2. Saponin

Sebanyak 1 mL larutan uji ditambahkan dengan 10 mL air panas, dinginkan dan dikocok kuat selama 10 menit. Hasil positif saponin bila buih yang terbentuk stabil selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm. Kemudian pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, buih tidak hilang (44) .

## 3. Fenolik

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambahkan dengan 2 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 5%. Pembentukan warna hijau atau hijau biru menunjukkan senyawa fenol (43).

## 4. Flavonoid

Sebanyak 1 mL larutan uji ditambahkan dengan 0,1 mg serbuk magnesium dan 3 tetes HCl pekat. Pembentukan warna merah, kuning atau jingga menunjukkan hasil flavonoid (43).

### 3.3.6 Aklimatisasi Hewan Percobaan

Mencit diaklimatisasi selama 5 hari (39) diberi makanan dan minuman yang cukup. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit dalam keadaan sehat, artinya selama aklimatisasi mencit tidak mengalami perubahan berat badan lebih dari 10% dan secara visual menunjukkan perilaku yang normal (13).

### 3.3.7 Dosis

Dosis awal yang diberikan pada hewan percobaan yaitu 300 mg/kg (31). Dosis lanjutan yang diberikan kepada kelompok uji mengikuti skema OECD 423 (Lampiran 3, Gambar. 11 ) yaitu dengan variasi dosis 2000 mg/kg dan 5000 mg/kg (31), kemudian untuk 1 kelompok kontrol dengan memberikan suspensi Na CMC 0,5%

### 3.3.8 Pembuatan Sediaan Uji

Ekstrak daun Dewandaru disiapkan berdasarkan konsentrasi masing- masing dosis yang direncanakan. Kemudian, ekstrak tersebut disuspensikan dengan Na

CMC 0,5%. Volume sediaan uji yang diberikan secara peroral adalah 1% dari berat badan hewan percobaan.

a) Pembuatan Suspensi Na CMC 0,5 %

Sebanyak 50 mg Na CMC ditaburkan kedalam lumpang panas yang berisi 1 mL air panas dan dibiarkan selama 15 menit. Kemudian digerus sampai homogen, tambahkan aquadest sampai volume 10 mL.

b) Pembuatan Suspensi Ekstrak daun Dewandaru

Sebanyak 50 mg Na CMC ditaburkan kedalam lumpang panas yang berisi 1 mL air panas dan dibiarkan selama 15 menit. Kemudian digerus sampai homogen. Tambahkan hasil ekstrak yang sudah ditimbang sesuai dengan dosis yang telah direncanakan, gerus homogen, lalu tambahkan aquadest sampai volume 10 mL.

### 3.3.9 Pengujian Toksisitas Akut

Sejumlah hewan percobaan dibagi secara acak menjadi 6 kelompok yaitu 5 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol. Setiap kelompok perlakuan diberikan ekstrak daun Dewandaru, sedangkan kelompok kontrol hanya diberikan suspensi Na CMC 0,5%. Sebelum dilakukan percobaan, mencit dipuasakan makan selama 3-4 jam.

Kelompok kontrol diberikan suspensi Na CMC 0,5%, 1 kelompok perlakuan diberi suspensi ekstrak daun Dewandaru secara peroral dengan dosis awal yaitu 300 mg/kg lalu dicatat jumlah hewan yang mati dalam 24 jam setelah pemberian sediaan uji. Sementara itu diamati juga gejala-gejala toksik yang mungkin terjadi secara visual seperti diare, aktivitas motorik, salivasi, perubahan kulit dan bulu, tremor dan lain-lain. Berdasarkan jumlah hewan yang mati dalam dosis awal, didapatkan dosis lanjutan yang merujuk pada skema OECD dan diakhir pengujian didapatkan nilai LD<sub>50</sub> serta dapat ditentukan ketoksikannya dalam klasifikasi GHS berdasarkan Annex 2c pada metode OECD 423.

### 3.3.10 Pengamatan Efek Toksik Tertunda Selama 14 hari (15)

Pengamatan toksisitas tertunda dilakukan selama 14 hari terhadap hewan yang masih hidup dan dihitung :

a. Persen perubahan berat badan

Pengamatan dilakukan setiap 2 hari cara menimbang berat badan masing-masing mencit dengan timbangan hewan kemudian dihitung persen perubahan berat badan yang dihitung dengan cara mengurangi berat badan hari berikutnya dengan berat badan hari ke-0.

b. Perhitungan jumlah konsumsi makan

Berikan sejumlah tertentu makanan, kemudian setelah 2 hari sisa makanan yang tinggal ditimbang. Hitung selisih antara berat makanan yang diberikan dan berat makanan yang tinggal.

c. Pengukuran jumlah konsumsi minum

Berikan sejumlah tertentu volume minuman. Setelah 2 hari diukur volume minuman yang tersisa. Hitung selisih antara volume yang diberikan dengan volume yang tersisa.

d. Perhitungan persen rasio bobot organ hati, ginjal, dan jantung

Bedah hewan percobaan dan ambi organ-organ penting seperti hati, ginjal, dan jantung lalu dibersihkan dan ditimbang, selanjutnya dihitung persen rasio bobot organ masing-masing hewan percobaan dengan rumus berikut:

$$\text{Persen rasio bobot organ} = \frac{\text{berat organ (gram)}}{\text{berat badan mencit (gram)}} \times 100 \%$$

### 3.3.11 Analisa Data

Nilai LD<sub>50</sub> yang didapatkan dari penelitian ini berupa Nilai LD<sub>50</sub> dan klasifikasi keamanan bahan berdasarkan GHS. Data hasil penelitian dari persen perubahan berat badan, jumlah konsumsi makanan dan jumlah konsumsi minum dianalisa secara statistik dengan ANOVA dua arah. Sedangkan data hasil penelitian persen rasio bobot organ dianalisa secara statistik dengan menggunakan ANOVA satu arah kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan jika hasil yang didapatkan berbeda signifikan.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun dewandaru yang sudah diidentifikasi oleh Herbarium Universitas Andalas (ANDA) Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Andalas Padang. Proses pengeringan sampel dilakukan di rumah kaca selama 7 hari, kemudian simplisia dirajang didapatkan simplisia halus dengan berat 1300 gram. Menurut Moeksin, semakin kecil ukuran sampel, maka semakin besar luas kontak area permukaan dengan pelarut sehingga menghasilkan metabolit sekunder yang terbaik dibandingkan kondisi basah dan kering dengan perlakuan langsung (45). Metode Ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode maserasi, karena memiliki beberapa keuntungan seperti, prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, metode ini tidak perlu dilakukan pemanasan sehingga bahan alam yang tidak tahan panas tidak akan terurai. Ekstraksi cara dingin memungkinkan banyak senyawa yang terekstraksi, walaupun beberapa senyawa memiliki kelarutan yang terbatas dalam pelarut ekstraksi pada suhu kamar (46).

#### 4.1 Penentuan Rendemen

Maserat yang didapatkan dari pemakaian 13 L pelarut etanol 70% dikumpulkan dan dilakukan penguapan pelarut untuk mendapatkan ekstrak kental dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu pemanasan 45 °C. Prinsip kerja dari rotary evaporator adalah penguapan berdasarkan titik didih pelarut dan dibantu dengan bantuan tekanan. Tekanan ini akan mempercepat proses penguapan menjadi ekstrak kental. Dari hasil penguapan dengan alat *rotary evaporator* didapatkan ekstrak kental daun dewandaru sebanyak 306 gram dengan hasil rendemen 23,5%.

$$\begin{aligned} \% \text{ rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak yang didapatkan}}{\text{berat serbuk simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{306 \text{ g}}{1300 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 23,5 \% \end{aligned}$$

Penentuan rendemen bertujuan untuk mengetahui jumlah simplisia yang dibutuhkan untuk pembuatan sejumlah tertentu ekstrak kental. Hasil rendemen yang tinggi menunjukkan bahwa senyawa kimia yang dapat tersari dalam ekstrak juga cukup besar (47). Berdasarkan hasil penelitian Kurniawati, hasil rendemen ekstrak etanol daun dewandaru yang didapatkan adalah 16,21% (48). Perbedaan hasil rendemen yang dihasilkan dapat disebabkan oleh metode ekstraksi yang digunakan, dan lamanya proses ekstraksi.

Ekstrak yang didapatkan perlu dilakukan karakterisasi ekstrak untuk mengetahui mutu ekstrak yang dihasilkan sesuai dengan pedoman yang berlaku, dalam hal ini farmakope herbal. Hasil karakterisasi setiap penelitian bisa saja berbeda tergantung kondisi penelitian dan sampel yang digunakan.

#### 4.2 Pemeriksaan Organoleptis

Hal pertama yang dilakukan adalah pemeriksaan organoleptis dari ekstrak yang didapatkan. Pemeriksaan ini dapat dilihat menggunakan panca indera, meliputi bentuk, bau, warna, dan rasa.

Tabel 5. Hasil pemeriksaan organoleptis

No	Pemeriksaan	Hasil
1	Bentuk	Cairan kental
2	Bau	Khas
3	Warna	Hijau kehitaman
4	Rasa	Pahit

#### 4.3 Penentuan Susut Pengerinan

Penentuan susut pengerinan bertujuan untuk memberikan batasan atau rentang maksimal senyawa yang dapat hilang pada proses pengerinan (42).

Sebelum dikeringkan, ekstrak yang telah ditimbang perlu didiamkan terlebih dahulu didalam desikator hingga kondisi suhu kamar. Pengeringan menggunakan oven pada suhu 105 °C dapat dihentikan jika sudah didapatkannya bobot yang konstan. Hasil perhitungan didapatkan nilai susut pengeringan ekstrak etanol daun dewandaru yaitu 9,62% (Tabel 6). Nilai ini menunjukkan banyaknya kadar air dan senyawa yang menguap dalam ekstrak setelah proses pemanasan pada suhu 105 °C. Kadar air terkait dengan kemurnian ekstrak dengan nilai maksimal yang dapat ditoleransi adalah 10%. Semakin sedikit kadar air pada ekstrak, maka semakin kecil kemungkinan ekstrak terkontaminasi dengan pertumbuhan mikroba (49). Pada penelitian ini, ketika zat yang menguap diasumsikan adalah air, maka nilai susut pengeringan ini dapat mewakili nilai kadar air dari ekstrak etanol daun dewandaru.

Tabel 6. Hasil penentuan susut pengeringan

No	Berat Kurs Kosong (g)	Berat Kurs + Ekstrak (g)	Berat Kurs + Hasil Pengeringan	Susut Pengeringan (%)
1	40,56	42,56	42,37	9,51%
2	33,07	35,07	34,87	10,01%
3	33,74	35,76	35,57	9,35%
Jumlah				28,88%
Rata-rata susut pengeringan (%)				9,62%

#### 4.4 Penentuan Nilai Kadar Abu Total

Penentuan nilai kadar abu total ekstrak, berguna untuk menggambarkan nilai kandungan mineral yang dikenal sebagai zat anorganik baik dari internal maupun eksternal yang berasal dari proses awal hingga terbentuknya ekstrak (42). Pengujian kadar abu dengan cara pemijaran menggunakan alat *carbolite furnace* selama 5 jam. Prinsip penentuan kadar abu adalah dengan pemanasan pada suhu tinggi (700°C) sehingga senyawa organik menguap dan hanya senyawa anorganik yang tertinggal (50). Hasil dari perhitungan didapatkan nilai kadar abu total ekstrak etanol daun dewandaru yaitu 3,20 % (Tabel 7). Nilai ini menunjukkan

bahwa kandungan mineral yang terkandung dalam ekstrak etanol daun dewandaru yang diperoleh dari proses maserasi hingga menjadi ekstrak adalah sebesar 3,20%.

Tabel 7. Hasil penentuan kadar abu total

No	Berat Kurs Kosong (g)	Berat Kurs + Ekstrak (g)	Berat Kurs + Hasil Pemijaran (%)	Kadar Abu (%)
1	43,95	45,95	44,00	2,78
2	38,73	40,74	38,82	4,12
3	40,40	42,40	40,45	2,70
Jumlah				9,60
Rata-rata Kadar Abu Total (%)				3,20

#### 4.5 Pengujian Fitokimia

Golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol daun dewandaru dapat dilihat dengan melakukan pengujian fitokimia. Peneliti menguji 4 golongan senyawa metabolit sekunder yaitu, alkaloid, fenolik, saponin, dan flavonoid. Pengujian ini memerlukan beberapa reagen spesifik untuk golongan senyawa metabolit sekunder yang berbeda seperti yang dijelaskan pada Tabel 8. Dari hasil pengujian fitokimia, didalam ekstrak etanol daun dewandaru positif terdapat golongan senyawa metabolit sekunder flavonoid, fenolik, dan saponin, tetapi negatif untuk golongan senyawa alkaloid. Terbukti dengan menggunakan dua pereaksi spesifik alkaloid yaitu mayer dan dragendorf tidak terlihat adanya pembentukan endapan. Hal ini berbeda dibandingkan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Supriyati, skrining fitokimia pada golongan senyawa alkaloid menunjukkan hasil yang positif (10). Perbedaan ini dapat disebabkan oleh kondisi lingkungan, umur tumbuhan dan lokasi pengambilan sampel yang berbeda. Menurut Purwati, pada skrining fitokimia yang berbeda juga disebabkan oleh kepekaan metode uji yang digunakan terhadap jumlah kandungan kimia dari sampel yang diuji (51). Skrining fitokimia yang diuji bisa saja tidak mampu mendeteksi kandungan bahan kimia yang terdapat pada daun

dewandaru yang jumlahnya hanya sedikit setelah melalui proses ekstraksi dan pemekatan.

Tabel 8. Hasil pemeriksaan kandungan golongan metabolit sekunder

No	Pemeriksaan	Pereaksi	Pengamatan	Hasil
1	Alkaloid	Mayer	Tidak terbentuk endapan putih	-
		Dragendorf	Tidak terbentuk endapan merah	-
2	Saponin	Air panas dan HCl 2N	Terbentuk buih	+
3	Fenol	FeCl <sub>3</sub>	Larutan biru tua	+
4	Flavonoid	Serbuk Mg dan HCl pekat	Larutan jingga	+

Keterangan :

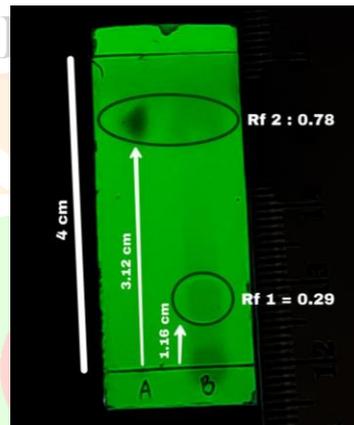
(+) : mengandung senyawa metabolit sekunder

(-) : tidak mengandung senyawa metabolit sekunder

#### 4.6 Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pengujian selanjutnya adalah pemeriksaan pola kromatogram KLT untuk melihat gambaran ada atau tidaknya senyawa kimia yang terkandung pada suatu sampel, hasilnya bisa dilihat dengan membandingkan pola noda dan nilai R<sub>f</sub> sampel uji dengan isolat senyawa kimia murni. Pada penelitian kali ini peneliti membandingkan pola kromatogram asam galat murni. Asam galat termasuk kedalam golongan senyawa kimia fenolik. Sebelumnya sudah dijelaskan pada pengujian fitokimia ekstrak etanol daun dewandaru mengandung golongan senyawa metabolit sekunder fenolik. Fase gerak yang digunakan pada pengujian kali ini adalah metanol : etil asetat (9:1). Berdasarkan Gambar 2, pola noda dilihat dibawah lampu UV pada panjang gelombang 365 nm. Profil KLT ekstrak etanol daun dewandaru, didapatkan pola noda yang sama dengan pembanding asam galat (Nilai R<sub>f2</sub> = 0,78). Hasil ini membuktikan bahwa pada ekstrak etanol daun dewandaru terbukti mengandung asam galat. Berdasarkan penelitian Isabelle,

yang melakukan pengujian profil kromatografi ekstrak etanol daun dewandaru, terdapat senyawa myricetin pada ekstrak dengan nilai  $R_f = 0,34$  (52). Nilai ini tidak jauh berbeda dengan hasil yang didapatkan pada ekstrak daun dewandaru ( $R_{f1} = 0,29$ ). Sehingga, dapat diduga senyawa tersebut adalah myricetin.



Gambar 2. Hasil analisis KLT (kromatografi lapis kertas)

(Keterangan : A = Asam galat murni, B = Ekstrak daun dewandaru)

#### 4.7 Pengujian Toksisitas Akut

Tujuan dasar pengujian toksisitas akut memungkinkan suatu zat dikategorikan sesuai dengan potensi bahayanya dan dosis yang menyebabkan toksisitas (53). Mencit yang digunakan berjenis kelamin betina dengan berat badan rata-rata berkisar 20-30 g. Sebelum dilakukannya pengujian toksisitas akut dan tertunda, mencit diaklimatisasi terlebih dahulu selama 5 hari, sesuai pedoman OECD 423 (39). Hal ini bertujuan untuk menseleksi mencit yang sehat dan sesuai ditandai dengan tidak mengalami perubahan berat badan lebih dari 10%. Tabel hasil aklimatisasi dapat dilihat pada Lampiran 3, Tabel 13. Jumlah mencit yang diaklimatisasi sebanyak 27 ekor dengan nilai selisih berat badan terendah -3% dan tertinggi 13%. Jumlah hewan yang dipilih pada pengujian toksisitas akut mengikuti skema OECD 423 (Lampiran 3, Gambar 11) sehingga hanya 18 ekor hewan percobaan yang digunakan pada penelitian kali ini.

Peneliti memilih metode OECD 423, karena metode ini dapat mengurangi jumlah hewan yang diminimalisir sehingga lebih mudah untuk mengontrol tanda

toksistasnya, dan dosis yang digunakan maksimal 5000 mg/kg karena menurut metode ini, dosis diatas 5000 mg/kg tidak perlu dilakukan untuk mengurangi *animalwelfare*. Sesuai dengan pedoman penilaian toksisitas produk obat herbal, dikatakan bahwa system uji alternatif yang divalidasi saat ini, sangat disarankan melakukan penggantian hewan percobaan karena merujuk pada 3R (Reduction, Refinement, and Replacement) (26). Nilai LD<sub>50</sub> dan klasifikasi GHS dapat diperkirakan langsung berdasarkan jumlah kematian yang merujuk pada skema (Lampiran 3, Gambar 11). Untuk pengujian toksisitas akut dilakukan selama 24 jam dengan mencatat tanda-tanda toksisitas selama 4 jam pertama. Sebelumnya mencit dipuaskan terlebih dahulu selama 4 jam, dengan tujuan pengosongan saluran cerna agar makanan tidak mempengaruhi toksisitas dari ekstrak yang akan diuji. Setiap perilaku hewan percobaan pada setiap kelompok dosis dibandingkan dengan kontrol yang hanya diberikan pembawa suspensi Na CMC 0,5%.

Dosis awal yang digunakan adalah dosis 300 mg/kg. Setiap dosis dilakukan pada 3 hewan percobaan. Pada dosis ini tidak ada hewan yang mati selama 24 jam, sehingga dilakukan pengulangan pada dosis yang sama dan diamati kematiannya. Hasil yang didapatkan tidak ada kematian pada setiap kelompok dosis hingga dosis 2000 mg/kg. Untuk memastikan nilai LD<sub>50</sub> besar dari 5000 mg/kg perlu dilakukan uji limit pada 3 hewan percobaan. Setelah dilakukannya pengujian dengan dosis 5000 mg/kg tidak ada satupun hewan percobaan yang mati, sehingga dapat dipastikan nilai LD<sub>50</sub> ekstrak daun dewandaru besar dari 5000 mg/kg dengan kategori GHS “unclassified”, artinya ekstrak daun dewandaru aman untuk dikonsumsi. Berdasarkan penelitian sebelumnya, nilai LD<sub>50</sub> dari ekstrak buah dewandaru yaitu 2408,3 mg/kg (5). Artinya LD<sub>50</sub> daun dewandaru lebih besar dibandingkan dengan buah dewandaru.

Penjelasan dosis letal perlu dipertimbangkan pada penggunaan obat herbal. Dalam kebanyakan kasus, masalah timbul karena penggunaan dalam dosis yang tidak tepat. Karena herbal maupun suplemen dapat menjadi racun untuk indikasi yang tidak tepat, atau dengan dosis besar yang berlebihan, dan untuk jangka waktu yang lama (54).

Sejumlah besar bahan kimia beracun yang diproduksi oleh tanaman (fitotoksin), merupakan metabolit sekunder sebagai mekanisme pertahanan terhadap hewan herbivora, terutama serangga dan mamalia. Senyawa ini mungkin bersifat akut untuk beberapa organisme. Senyawa yang tergolong fitotoksin ini adalah sulfur, lipid, fenol, alkaloid glikosida, dan banyak jenis senyawa kimia lainnya (30). Senyawa fitotoksin yang diduga dalam ekstrak daun dewandaru adalah saponin, dimana senyawa ini dapat menyebabkan hemolisis pada darah. Beberapa peneliti sudah menghubungkan struktur dengan efek toksik dari beberapa golongan kimia steroid, triterpenoid dan saponin. Terbukti bahwa senyawa kimia saponin yang lebih banyak menyebabkan efek toksik (55).

Tabel 9. Pengamatan gejala toksik secara visual

No	Gejala toksik	K	DI	DII	DIII	DIV	DV
1	Diare	×	×	×	×	×	√
2	Terengah-engah	×	×	×	×	×	√
3	Aktivitas motorik	aktif	aktif	kurang aktif	tidak aktif	tidak aktif	tidak aktif
4	Aktivitas menggeliat	×	×	×	×	×	×
5	Tremor	×	×	×	×	×	√
6	Salivasi	×	×	×	√	√	√
7	Perubahan kulit dan bulu	×	×	×	×	×	×

Keterangan :

K : Na CMC 0,5%

DI : 300 mg/kg

DII : 300 mg/kg (pengurangan dosis)

DIII : 2000 mg/kg

DIV : 2000 mg/kg (pengurangan dosis)

DV : 5000 mg/kg

Pengamatan gejala toksik perlu dilakukan untuk menggambarkan gejala toksik yang timbul pada penggunaan dosis besar ekstrak daun Dewandaru. Berdasarkan pedoman OECD dilakukan pengamatan gejala toksik selama 4 jam setelah pemberian sediaan secara akut (39). Hasil pengamatan gejala toksik yang dilakukan selama 4 jam tertera pada Tabel 9. Berdasarkan pengamatan, pada dosis 300 mg/kg baik dosis awal maupun dosis ulangan gejala toksik yang terlihat hanya aktivitas motorik mencit yang terlihat kurang aktif pada 4 jam pertama. Untuk dosis 2000 mg/kg terjadi pengurangan aktivitas motorik yang terlihat lebih diam. Gejala lain terlihat adanya salivasi pada mencit pada dosis 2000 mg/kgBB dan 5000 mg/kgBB. Salivasi ini bisa diakibatkan oleh munculnya efek kolinergik, merupakan sekelompok zat yang dapat menstimulasi susunan saraf parasimpatis. Efek kolinergik antara lain adalah memperkuat gerakan peristaltik dan sekresi kelenjar ludah (56). Pada dosis 5000 mg/kg, muncul beberapa gejala toksik seperti terengah-engah, tremor, salivasi, dan adanya diare terlihat pada kertas saring yang sudah diberikan larutan CuSO<sub>4</sub> 1%. Efek tremor disebabkan karena adanya rangsangan sistem parasimpatis yang dapat menyebabkan gerakan tidak terkendali.

#### **4.8 Pengujian Toksisitas Tertunda**

Pengamatan efek tertunda ekstrak daun dewandaru dilakukan selama 14 hari dengan melihat beberapa parameter antara lain jumlah konsumsi makan, jumlah konsumsi minum, persen perubahan berat badan dan persen rasio bobot organ. Parameter ini berguna sebagai data tambahan untuk melihat adanya reversibilitas dari respon toksisitas dan mendapatkan perkiraan kualitatif organ target (15).

##### **4.8.1 Perhitungan Jumlah Konsumsi Makan**

Hasil Perhitungan jumlah konsumsi makan, umumnya jumlah konsumsi makan kelompok dosis lebih kecil dibandingkan dengan kelompok kontrol. Jumlah konsumsi makan mencit terendah berada pada dosis 2000 mg/kg dan 5000 mg/kg. Penurunan nafsu makan dapat diakibatkan oleh penekanan hormon *ghrelin* yang merupakan hormon lapar (56). Rata-rata mencit mengalami penurunan

konsumsi makan pada hari ke-4, sedangkan untuk hari selanjutnya mengalami perubahan naik turun, dan meningkat pada hari ke-14 (Tabel 10). Meningkatnya jumlah konsumsi makan, hingga kondisi normal diakibatkan karna sebagian besar toksikan telah dieksresikan.

Tabel 10. Pengaruh dosis dan waktu terhadap jumlah konsumsi makan mencit putih betina selama 14 hari

Kelompok	Jumlah konsumsi makan (g) ± SE (Standar Error) hari ke-							Rata-Rata ± SE
	2	4	6	8	10	12	14	
Kontrol	11,49 ± 0,472	10,14 ± 0,472	8,45 ± 0,472	6,76 ± 0,472	9,35 ± 0,472	6,56 ± 0,472	7,21 ± 0,472	8,57 ± 0,179 <sup>d</sup>
300 mg/kg A	5,16 ± 0,472	4,35 ± 0,472	7,23 ± 0,472	4,48 ± 0,472	6,08 ± 0,472	4,59 ± 0,472	5,22 ± 0,472	5,30 ± 0,179 <sup>ab</sup>
300 mg/kg B	5,58 ± 0,472	5,31 ± 0,472	4,51 ± 0,472	4,92 ± 0,472	5,46 ± 0,472	3,53 ± 0,472	4,25 ± 0,472	4,80 ± 0,179 <sup>a</sup>
2000 mg/kg A	9,15 ± 0,472	8,35 ± 0,472	5,75 ± 0,472	4,00 ± 0,472	7,18 ± 0,472	6,18 ± 0,472	7,97 ± 0,472	6,94 ± 0,179 <sup>c</sup>
2000 mg/kg B	8,11 ± 0,472	4,70 ± 0,472	4,24 ± 0,472	5,55 ± 0,472	5,63 ± 0,472	2,91 ± 0,472	5,77 ± 0,472	5,27 ± 0,179 <sup>ab</sup>
5000 mg/kg	5,61 ± 0,472	5,61 ± 0,472	8,85 ± 0,472	4,83 ± 0,472	4,53 ± 0,472	3,34 ± 0,472	6,19 ± 0,472	5,57 ± 0,179 <sup>b</sup>
Rata-Rata ± SE	7,52 ± 0,193 <sup>s</sup>	6,41 ± 0,193 <sup>r</sup>	6,51 ± 0,193 <sup>t</sup>	5,09 ± 0,193 <sup>q</sup>	6,37 ± 0,193 <sup>f</sup>	4,52 ± 0,193 <sup>p</sup>	6,10 ± 0,193 <sup>t</sup>	

Keterangan : <sup>a,b,c,d</sup> adalah superskrip yang berbeda pada kolom yang sama  
<sup>p,q,r</sup> adalah superskrip yang berbeda pada baris yang sama

Hasil perhitungan statistik (Lampiran 2. Tabel 21) dosis ekstrak daun dewandaru, waktu pengamatan, dan interaksi antara dosis dan waktu pengamatan mempengaruhi jumlah konsumsi makan mencit secara bermakna ( $p < 0,05$ ). Artinya ekstrak daun dewandaru memberikan efek toksisitas tertunda.

#### 4.8.2 Perhitungan Jumlah Konsumsi Minum

Berdasarkan Perhitungan jumlah konsumsi minum (Tabel 11), pada awal pengamatan rata-rata jumlah konsumsi minum tertinggi berada pada kelompok kontrol, sedangkan untuk nilai terendah berada pada kelompok dosis 2000 mg/kg dan 5000 mg/kg. Rata-rata mencit mengalami penurunan konsumsi makan pada hari ke-4, sedangkan untuk hari selanjutnya mengalami perubahan naik turun, dan meningkat pada hari ke-14. Meningkatnya jumlah konsumsi minum, hingga kondisi normal diakibatkan karna sebagian besar toksikan telah dieksresikan.

Tabel 11. Pengaruh dosis dan waktu terhadap jumlah konsumsi minum mencit putih betina selama 14 hari

Kelompok	Jumlah konsumsi minum (mL) $\pm$ SE (Standar Error) hari ke-							Rata-Rata $\pm$ SE
	2	4	6	8	10	12	14	
Kontrol	9,27 $\pm$ 0,571	4,67 $\pm$ 0,466	5,33 $\pm$ 0,466	6,67 $\pm$ 0,466	6,67 $\pm$ 0,466	7,67 $\pm$ 0,466	8,66 $\pm$ 0,466	7,00 $\pm$ 0,182 <sup>b</sup>
300 mg/kg A	9,00 $\pm$ 0,466	6,00 $\pm$ 0,466	6,00 $\pm$ 0,466	5,33 $\pm$ 0,466	5,67 $\pm$ 0,466	6,67 $\pm$ 0,466	7,00 $\pm$ 0,466	6,52 $\pm$ 0,176 <sup>b</sup>
300 mg/kg B	6,00 $\pm$ 0,466	7,00 $\pm$ 0,466	6,67 $\pm$ 0,466	6,33 $\pm$ 0,466	6,67 $\pm$ 0,466	7,67 $\pm$ 0,466	7,33 $\pm$ 0,466	6,81 $\pm$ 0,176 <sup>b</sup>
2000 mg/kg A	8,8 $\pm$ 0,571	5,67 $\pm$ 0,466	5,33 $\pm$ 0,466	4,66 $\pm$ 0,466	4,67 $\pm$ 0,466	5,00 $\pm$ 0,466	6,00 $\pm$ 0,466	5,73 $\pm$ 0,176 <sup>a</sup>
2000 mg/kg B	4,33 $\pm$ 0,466	5,67 $\pm$ 0,466	5,33 $\pm$ 0,466	6,33 $\pm$ 0,466	6,00 $\pm$ 0,466	4,33 $\pm$ 0,466	5,33 $\pm$ 0,466	5,33 $\pm$ 0,176 <sup>a</sup>
5000 mg/kg	6,00 $\pm$ 0,466	6,33 $\pm$ 0,466	5,00 $\pm$ 0,466	4,00 $\pm$ 0,466	5,00 $\pm$ 0,466	5,00 $\pm$ 0,466	6,00 $\pm$ 0,466	5,33 $\pm$ 0,176 <sup>a</sup>
Rata-Rata $\pm$ SE	7,23 $\pm$ 0,206 <sup>q</sup>	5,89 $\pm$ 0,190 <sup>p</sup>	5,61 $\pm$ 0,190 <sup>p</sup>	5,55 $\pm$ 0,190 <sup>p</sup>	5,78 $\pm$ 0,190 <sup>p</sup>	6,06 $\pm$ 0,190 <sup>p</sup>	6,72 $\pm$ 0,190 <sup>q</sup>	

Keterangan : <sup>a,b</sup> adalah superskrip yang berbeda pada kolom yang sama

<sup>p,q</sup> adalah superskrip yang berbeda pada baris yang sama

Hasil perhitungan statistik (Lampiran 2. Tabel 26) dosis ekstrak daun dewandaru, waktu pengamatan, dan interaksi antara dosis dan waktu pengamatan

mempengaruhi jumlah konsumsi minum mencit secara bermakna ( $p < 0,05$ ). Artinya ekstrak daun dewandaru memberikan efek toksisitas tertunda.

#### 4.8.3 Perhitungan Persen Perubahan Berat Badan

Berdasarkan Perhitungan terhadap persen perubahan berat badan (Tabel 12), kelompok kontrol memiliki rata-rata perubahan berat badan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok dosis. Hasil yang berbeda terlihat pada kelompok dosis 5000 mg/kg, rata-rata pada dosis ini terjadinya penurunan berat badan ditandai dengan angka yang bernilai negatif. Efek penekanan hormon *ghrelin* dapat menyebabkan penurunan konsumsi makan sehingga akan berdampak pula pada penurunan berat badan. Pada hari ke-14 rata-rata hewan percobaan mengalami kenaikan berat badan, baik kelompok kontrol maupun kelompok dosis. Artinya pada hari terakhir pengamatan sebagian besar toksikan telah dieksresikan.

Tabel 12. Pengaruh dosis dan waktu terhadap persen perubahan berat badan mencit putih betina selama 14 hari

Kelompok	% Perubahan Berat Badan $\pm$ SE (Standar Error) hari ke-							Rata-Rata $\pm$ SE
	2	4	6	8	10	12	14	
Kontrol	4,28 $\pm$ 2,579	6,06 $\pm$ 2,579	4,82 $\pm$ 2,579	4,47 $\pm$ 2,579	5,28 $\pm$ 2,579	5,23 $\pm$ 2,579	4,35 $\pm$ 2,579	4,93 $\pm$ 0,975 <sup>d</sup>
300 mg/kg A	-0,02 $\pm$ 2,579	2,18 $\pm$ 2,579	3,61 $\pm$ 2,579	4,40 $\pm$ 2,579	4,28 $\pm$ 2,579	2,42 $\pm$ 2,579	2,35 $\pm$ 2,579	2,75 $\pm$ 0,975 <sup>bcd</sup>
300 mg/kg B	4,58 $\pm$ 2,579	5,27 $\pm$ 2,579	3,98 $\pm$ 2,579	3,30 $\pm$ 2,579	5,33 $\pm$ 2,579	3,60 $\pm$ 2,579	3,66 $\pm$ 2,579	4,25 $\pm$ 0,975 <sup>cd</sup>
2000 mg/kg A	0,12 $\pm$ 2,579	-1,05 $\pm$ 2,579	3,18 $\pm$ 2,579	0,09 $\pm$ 2,579	0,30 $\pm$ 2,579	-0,4 $\pm$ 2,579	2,20 $\pm$ 2,579	0,64 $\pm$ 0,975 <sup>b</sup>
2000 mg/kg B	2,40 $\pm$ 2,579	0,37 $\pm$ 2,579	2,26 $\pm$ 2,579	2,14 $\pm$ 2,579	1,65 $\pm$ 2,579	1,72 $\pm$ 2,579	1,08 $\pm$ 2,579	1,66 $\pm$ 0,975 <sup>bc</sup>
5000 mg/kg	-4,95 $\pm$ 2,579	-1,65 $\pm$ 2,579	-2,97 $\pm$ 2,579	-2,72 $\pm$ 2,579	-2,89 $\pm$ 2,579	-2,53 $\pm$ 2,579	-1,05 $\pm$ 2,579	-2,64 $\pm$ 0,975 <sup>a</sup>

Rata-Rata ± SE	1,07 ± 1,053	1,86 ± 1,053	2,48 ± 1,053	1,95 ± 1,053	2,33 ± 1,053	1,72 ± 1,053	2,1 ± 1,053	
----------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	-------------	--

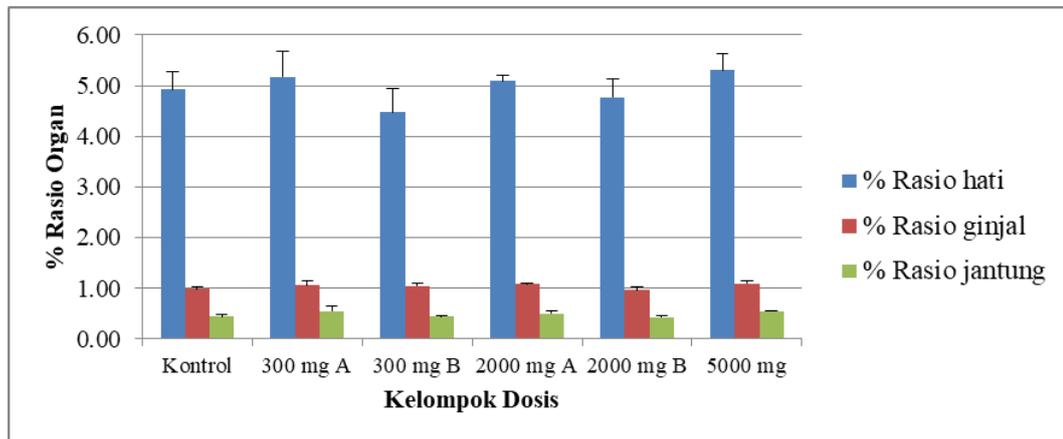
Keterangan : <sup>a,b,c,d</sup> adalah superskrip yang berbeda pada kolom yang sama

Hasil perhitungan statistik (Lampiran 2. Tabel 29) dosis ekstrak daun dewandaru mempengaruhi persen perubahan berat badan mencit secara bermakna ( $p < 0,05$ ). Sedangkan untuk waktu pengamatan dan interaksi antara dosis dan waktu pengamatan tidak mempengaruhi persen perubahan berat badan mencit secara bermakna ( $p > 0,05$ ).

#### 4.8.4 Perhitungan Persentase Rasio Bobot Organ

Pembedahan hewan dilakukan pada hari pengamatan ke-15. Organ yang diambil yaitu organ hati, ginjal dan jantung merupakan organ yang berpotensi besar terkena dampak dari paparan zat toksik. Alasan pemilihan organ ini sebagai data penelitian adalah karena hati, dan ginjal merupakan organ ekskresi utama sedangkan jantung merupakan organ yang memiliki aliran darah yang tinggi (22). Sebelum pembedahan, perlu di catat berat badan hewan, untuk dapat menghitung persen rasio bobot organ. Pencatatan berat badan hewan dilakukan pada waktu yang sama pada setiap kelompok hewan percobaan.

Organ yang diambil kemudian dilihat secara visual apakah ada perbedaan yang jelas dengan kelompok kontrol. Berdasarkan pengamatan, tidak ada perbedaan yang signifikan pada organ hati, ginjal, dan jantung dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dari hasil diagram (Gambar 3) kelompok kontrol dan kelompok dosis memiliki persen rasio bobot organ hati yang berbeda, ditandai dengan dosis 5000 mg/kg yang memiliki nilai rasio bobot organ paling tinggi, hal ini dapat disebabkan pemberian toksikan dalam jumlah yang besar menyebabkan peradangan pada sel organ hati sehingga terjadinya pembengkakan dan edema pada sel hati tersebut. Sedangkan untuk persen rasio bobot organ ginjal dan jantung tidak ada perbedaan yang jelas antara setiap kelompok dosis. Pemeriksaan histopatologi penting dilakukan sebagai data yang akurat jika terlihat adanya perubahan tekstur, warna dan volume organ pada hewan percobaan(57).



Gambar 3. Diagram batang hubungan dosis terhadap persentasi rasio bobot organ hati, ginjal, jantung pada mencit putih betina

Hasil perhitungan statistik persentasi rasio bobot organ dianalisa dengan metode statistik ANOVA satu arah. Dimana nilai signifikansi yang didapatkan untuk ketiga organ yaitu  $>0.05$  (Lampiran 3, Tabel 33) artinya dosis ekstrak daun dewandaru tidak mempengaruhi persen rasio bobot organ. Untuk memperkuat data toksisitas ekstrak daun dewandaru, perlu dilakukan pengujian lanjutan mengenai pemeriksaan organ hati secara mikroskopis. Hal ini diperkuat berdasarkan Gambar 3, persen rasio bobot organ yang terlihat berbeda jauh yaitu terdapat pada organ hati.

Penggunaan metode uji toksisitas akut berdasarkan OECD 423 ini menghasilkan nilai Standar Error yang cukup besar terutama pada parameter persen perubahan berat badan, hal ini bisa disebabkan oleh sedikitnya hewan percobaan yang digunakan. Dibandingkan dengan metode toksisitas akut lainnya, metode ini yang menggunakan hewan percobaan paling sedikit yaitu 3 hewan percobaan pada setiap tahapan dosis. Metode farmakope Indonesia III, menggunakan hewan percobaan yang lebih banyak karena diperlukannya uji pendahuluan terlebih dahulu dalam penentuan rentang dosis yang diuji, ini berguna dalam perhitungan nilai  $LD_{50}$  agar hasil yang didapatkan lebih akurat. Disamping itu, pertimbangan dasar pemilihan pengujian toksisitas akut metode OECD 423 ini adalah karena peneliti lebih meminimalisir penggunaan hewan percobaan untuk memperhatikan kesejahteraan hewan.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian uji toksisitas akut dan toksisitas tertunda ekstrak daun dewandaru pada mencit, dapat disimpulkan bahwa :

1. Nilai LD<sub>50</sub> ekstrak daun dewandaru adalah >5000 mg/kg dengan klasifikasi GHS “unclassified” artinya ekstrak daun dewandaru aman dikonsumsi
2. Ekstrak daun dewandaru mempengaruhi gejala toksik pada mencit putih betina terutama pada diare, tremor, salivasi, dan terengah-engah
3. Data statistik ANOVA dua arah menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara faktor perlakuan dan interaksinya terhadap jumlah konsumsi makan dan jumlah konsumsi minum ( $p < 0,05$ ). Hasil persentase perubahan berat badan menunjukkan waktu dan interaksi faktor perlakuan tidak mempengaruhi persen perubahan berat badan secara bermakna ( $p > 0,05$ ), tetapi dosis memberikan pengaruh yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Data statistik ANOVA satu arah menunjukkan dosis tidak mempengaruhi persen rasio bobot organ secara bermakna ( $p > 0,05$ ).

#### 5.2 Saran

Diharapkan adanya penelitian lanjutan untuk melakukan pengujian organ hati secara mikroskopik agar dapat menggambarkan gambaran histopatologi setelah pemaparan akut.

## DAFTAR PUSTAKA

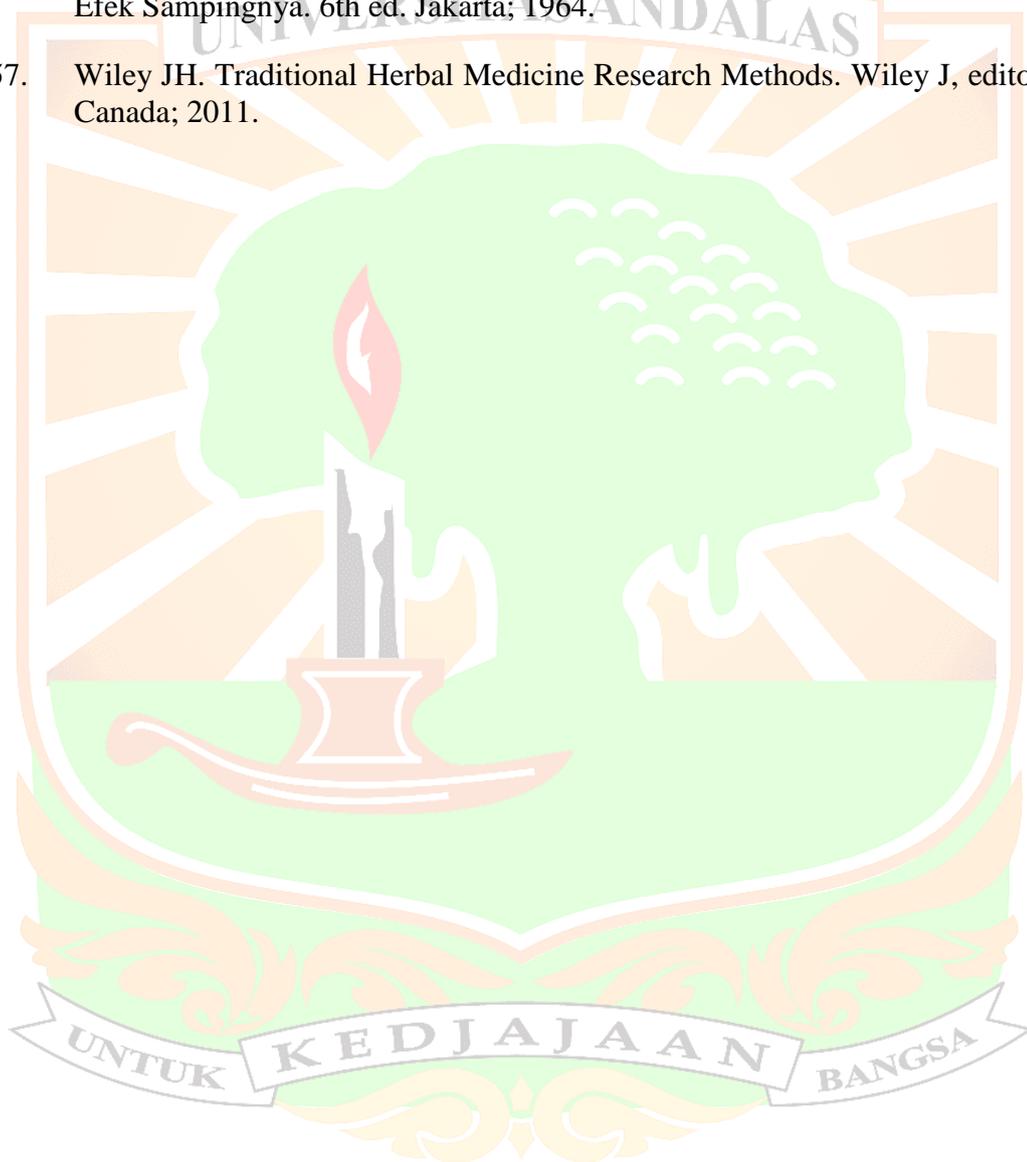
1. Menkes RI. *Formularium Ramuan Obat Tradisional*. Jakarta: Kemenkes RI; 2017.
2. Endang H. *Analisis Fitokimia*. 1th ed. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran (EGC); 2016.
3. Porwal M, Khan NA, Maheshwari KK. Evaluation of Acute and Subacute Oral Toxicity Induced by Ethanolic Extract of *Marsdenia tenacissima* Leaves in Experimental Rats. *Sci Pharm Artic*. 2017;85.
4. Rahmi M, Aria M, Nur'Aini R. Uji Aktivitas Analgesik Ekstrak Etanol Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) Dengan Induksi Termik Secara In Vivo. *Sci J Farm dan Kesehat*. 2017;7(2):134–40.
5. Onwudiwe N, Njoku O, Joshua P. Phytochemical Analysis and Acute Toxicity/Lethality Study of Ethanol Extract of *Eugenia uniflora* Pulp. *J Pharmacogn Phytochem*. 2010;2(4):336–9.
6. Ramalingum N, Mahomoodally MF. The Therapeutic Potential of Medicinal Foods. *Adv Pharmacol Sci*. 2014;2014.
7. IPBiotics. View Tumbuhan Obat [Internet]. Bogor Agricultural University. 2014 [cited 2019 Nov 21]. Available from: <http://ipbiotics.apps.cs.ipb.ac.id/index.php/tumbuhanObat/301>
8. Falcão TR, Araújo AA De, Alberto L. Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. *Biomed Cent*. 2018;18:1–12.
9. Umayasari E, Inandha LV, Ponco MR. Aktivitas Antihipertensi dari Ekstrak Etanol Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) pada Tikus Putih Jantan yang Diinduksi Adrenalin. *J Farm Indones*. 2015;12(1):1–6.
10. Supriyati N, Mujahid R. Efek Sitotoksik Ekstrak Etanolik Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) Terhadap Sel Kanker Payudara T47D Dan MCF-7 and MCF-7 Cell Lines. 2010;3(1):17–23.
11. Santos KKA, Matias EFF, Tintino SR, Souza CES, Braga MFBM, Guedes GMM, et al. Anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Exp Parasitol*. 2012;131(1):130–2.
12. Sasmito WA, Wijayanti AD, Fitriana I. Pengujian Toksisitas Akut Obat Herbal Pada Mencit Berdasarkan Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J Sains Vet*. 2015;33(2):234–9.
13. Nirwanto, Ariadi A, Arifin H. Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun

- Kirinyuh (*Chromolaena Odorata* (L) R.M. King & H. Rob) Pada Mencit Putih Jantan. *Med Heal Sci J*. 2018;1(2):31–40.
14. Armenia N, Hercegovina, Gustinanda D, Salasa AN, Yuliandra Y, Friardi. Acute and Delayed Toxicity Study of *Cassytha filiformis* Deffatted Ethanolic Ekstract. *World J Pharm Pharm Sci*. 2015;4(10).
  15. Casarett, Doull's. *Toxicology The Basic Science of Poisons*. 6th Editio. Klassen CD, editor. Mc-Graw-Hill; 2001.
  16. Schapoval EES, Silveira SM, Miranda ML, Alice CB, Henriques AT. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *J Ethnopharmacol*. 1994;44(3):137–42.
  17. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (1) Jilid 2*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan; 2001.
  18. Media SSB. *Eugenia uniflora* Scientific Name. *Edible Med Non-Medicinal Plants*. 2012;3:620–30.
  19. Becker NA, Volcão LM, Camargo TM, Freitag RA, Ribeiro GA. Biological Properties Of *Eugenia uniflora* L. Essential Oil: Chemical Composition And Antimicrobial Activity. *Vitalle - Rev Ciências da Saúde*. 2017;29(1):22–30.
  20. Menkes RI. *100 Top Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta: Balai Besar Litbang; 2011. 214 p.
  21. Menkes RI. *Farmakope Indonesia III*. Jakarta: Kemenkes RI; 1979.
  22. Lippincott, Wilkins W&. *Pharmacology 5th Editio*. Harvey A R, editor. Wolters Kluwer Health. 2012.
  23. Loomis TA, Haves AW. *Loomis's Essentials of Toxicology*. Fourth Edi. Amerika: Academic Press; 1978.
  24. Badan POM RI. *Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara In Vivo*. In Jakarta: Badan POM RI; 2014, p. 112.
  25. Lu F. *Toksikologi Dasar ; Asas, Organ Sasaran dan Penilaian Resiko*. Edisi 2. Jakarta: Universitas Indonesia; 1995.
  26. Aydin A, Aktay G, Yesilada E. A Guidance Manual for the Toxicity Assesment of Traditional Herbal Medicines. *Nat Prod Commun*. 2016;
  27. Gribaldo L, Gennari A, Blackburn H, Clemedson C, Deguercy A, Meneguz A, et al. Acute toxicity. 2005;420(5):1–20.

28. Furst A. Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs And Risk Assessment. Vol. 11, Journal of the American College of Toxicology. 1992. 379–379 p.
29. Dewi PS, Anisa IN, Ayuza SS. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Sirih Merah (*Piper crocatum* Luiz). Univ Jenderal Ahmad Yani. 2018;(January).
30. Hodgson E. A Textbook of Modern Toxicology. 3rd ed. United States: Wiley Interscience; 1932.
31. OECD. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Oecd Guidel Test Chem. 2001;(December):1–14.
32. Ta GC, Mokhtar M Bin, Peterson PJ, Yahaya N Bin. A Comparison of Mandatory and Voluntary Approaches to the Implementation of Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals ( GHS ) in the Management of Hazardous Chemicals. 2011;(1272):765–73.
33. Deleranko MJ, Hollinger M. Handbook of Toxicology : Second Edition. CRC Press; 2002. 1–1291 p.
34. Weil CS. Tables for Convenient Calculation of Median-Effective Dose ( LD50 or ED50 ) and Instructions in Their Use. Vol. 8. International Biometric Society; 2014. 249–263 p.
35. Harmita, Radji M. Buku Ajar Analisis Hayati. 3rd ed. July M, editor. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran (EGC); 2008.
36. Schlede E, Genschow E, Spielmann H, Stropp G, Kayser D. Oral acute toxic class method: A successful alternative to the oral LD 50 test. Regul Toxicol Pharmacol. 2005;42(1):15–23.
37. Diener W, Schlede E. Acute Toxic Class Methods : Alternatives to LD/LC50 Tests. ALTEX. 1999;1:129–34.
38. Erik W. Acute Oral Toxicity. JSTOR. 2014;106:497–503.
39. OECD. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Paris: Environment directorate; 2001. 1–14 p.
40. Directorate E. Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing Number 24. 2001;(24).
41. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Herbal Indonesia. 1st ed. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2008.
42. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. 1st ed. Jakarta: Direktorat Jendral POM; 2000.

43. Syafitri, Novilia E, Bintang M, Falah S. Kandungan Fitokimia, Total Fenol, dan Total Flavonoid Ekstrak Buah Harendong (*Melastoma affine* D. Don). *Curr Biochem*. 2014;1(3):105–15.
44. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Materia Medika Jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1989.
45. Moeksin R, Stevanus R. Pengaruh Kondisi, Perlakuan, dan Berat Sampel terhadap Ekstraksi Antosianin dari Kelopak Bunga Rosela dengan Pelarut Aquadest dan Etanol. *J Tek Kim*. 2009;16(4):11–8.
46. Nurhasnawati H, Sukarmi, Handayani F. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Bol (*Syzygium malaccense* L.). *J Ilm Manuntung*. 2017;3(1):91–5.
47. Kartikasari D, Pramono S, Farmasi F, Ahmad U, Farmasi F, Gadjah U, et al. Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Etanol Daun Bertoni (*Stevia rebaudiana*) Dari Tiga Tempat Tumbuh. 2008;145–51.
48. Kurniawati P, Maulida IR, Muhaimin. The determination of antioxidant activity of Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) leaves extract using FRAP method. *AIP Conf Proc*. 2017;1911(December).
49. Gangga E, Purwati R, Farida Y. Penetapan Parameter Mutu Ekstrak yang Memiliki Aktivitas sebagai Antioksidan dari Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata* L. Miers.) (Determination of Quality Parameters and Antioxidant Activity of Cincau Hijau Leaves (*Cyclea barbata* L. Miers.)). *J Ilmu Kefarmasian Indones*. 2017;15(2):236–43.
50. Sumiwi SA, Muhtadi A, Marline A, Zuhrotun A, Tjitraesmi A. Penetapan Parameter Standarisasi Ekstrak Herba Putrimalu (*Mimosa pudica* Linn.) dan Uji Toksisitas Akut Pada Mencit. 2013;(November):6–7.
51. Purwati S, Lumowa S, Samsurianto. Skrining Fitokimia Daun Saliara (*Lantana camara* L) Sebagai Pestisida Nabati Penekan Hama dan Insidensi Penyakit pada Tanaman. 2017;153–8.
52. Bezerra ICF, Ramos RTDM, Ferreira MRA, Soares LAL. Chromatographic profiles of extractives from leaves of *Eugenia uniflora*. *Rev Bras Farmacogn* [Internet]. 2018;28(1):92–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.11.002>
53. Creton S, Dewhurst IC, Earl LK, Gehen SC, Guest RL, Hotchkiss JA, et al. Acute toxicity testing of chemicals — Opportunities to avoid redundant testing and use alternative approaches. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(June 2009):50–83.

54. Phua DH, Zosel A, Heard K. Dietary supplements and herbal medicine toxicities-when to anticipate them and how to manage them. *Int J Emerg Med.* 2009;2(2):69–76.
55. Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: A review. *Phytochem Rev.* 2010;9(3):425–74.
56. Tan hoan tjay, Kirana R. *Obat-Obat Penting : Khasiat, Penggunaan dan Efek Sampingnya.* 6th ed. Jakarta; 1964.
57. Wiley JH. *Traditional Herbal Medicine Research Methods.* Wiley J, editor. Canada; 2011.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Data Penelitian

Tabel 13. Data hasil selisih berat badan mencit putih betina selama 5 hari aklimatisasi

Kelompok	Berat Badan Awal (g)	Berat Badan Akhir (g)	% Selisih Berat Badan
1	22,5	23,9	6%
	18,7	20,5	10%
	25	26,3	5%
	20,5	22,4	9%
	19,9	21,3	7%
2	25	24,8	-1%
	22,5	23	2%
	22,7	24,4	7%
	23,8	25,3	6%
	19,9	22,4	13%
3	25,1	26	4%
	26,1	25,2	-3%
	23,7	24,2	2%
	23,2	24,1	4%
	19,4	21,3	10%
4	24,8	26	5%
	25,8	26,9	4%
	23,4	24	3%
	31,6	32,4	3%
	26,2	27,3	4%
	24,3	26,4	9%
5	25,5	26,4	4%
	27,1	27,5	1%
	28,3	26,9	-5%
	27,1	28	3%
	29	28,7	-1%
	25,7	26,7	4%

### Lampiran 1. (Lanjutan)

Tabel 14. Jumlah konsumsi makan mencit putih betina selama 14 hari

Kelompok	No hewan	Jumlah konsumsi Makan (g)						
		hari ke	hari ke	hari ke	hari ke	hari ke	hari ke	hari ke
		2	4	6	8	10	12	14
Kontrol	1	9.67	8.56	7.04	5.71	8.00	5.47	6.00
	2	12.00	10.78	9.01	7.13	9.91	6.92	7.55
	3	12.80	11.07	9.29	7.44	10.14	7.30	8.09
300 mg/kg A	1	5.69	4.68	7.88	4.92	6.70	4.96	5.62
	2	5.33	4.66	7.56	4.63	6.22	4.77	5.53
	3	4.47	3.72	6.26	3.90	5.32	4.04	4.52
300 mg/kg B	1	5.98	5.70	4.85	5.17	5.70	3.70	4.41
	2	5.07	4.79	4.03	4.36	4.90	3.15	3.84
	3	5.69	5.44	4.66	5.23	5.78	3.74	4.51
2000 mg/kg A	1	10.00	9.19	6.28	4.29	7.80	6.54	8.56
	2	8.86	7.73	5.16	3.65	6.53	5.62	7.22
	3	8.59	8.12	5.82	4.05	7.20	6.38	8.14
2000 mg/kg B	1	9.18	5.23	4.76	6.21	6.25	3.29	6.55
	2	8.03	4.69	4.09	5.36	5.45	2.70	5.27
	3	7.12	4.17	3.87	5.07	5.19	2.74	5.49
5000 mg/kg	1	6.27	6.03	7.32	5.16	4.96	3.59	6.52
	2	6.22	6.33	7.73	5.61	5.15	3.81	7.17
	3	4.34	4.47	5.50	3.72	3.47	2.62	4.89

**Lampiran 1. (Lanjutan)**

Tabel 15. Jumlah konsumsi minum mencit putih betina selama 14 hari

Kelompok	No hewan	Jumlah konsumsi Minum (mL)						
		Hari ke 2	Hari ke 4	hari ke 6	hari ke 8	hari ke 10	hari ke 12	hari ke 14
Kontrol	1	9.84	5.14	5.82	7.15	7.25	8.11	9.30
	2	8.71	4.32	4.78	6.09	6.07	6.97	7.85
	3	8.45	4.54	5.39	6.76	6.69	7.92	8.84
300 mg/kg A	1	9.92	6.45	6.54	5.85	6.24	7.20	7.54
	2	9.29	6.42	6.27	5.51	5.80	6.93	7.41
	3	7.79	5.13	5.19	4.64	4.96	5.87	6.06
300 mg/kg B	1	6.71	7.52	7.12	6.76	7.30	8.25	7.72
	2	6.65	7.90	7.52	7.36	7.59	8.74	8.49
	3	4.64	5.57	5.36	4.88	5.11	6.01	5.79
2000 mg/kg A	1	7.86	4.78	4.44	3.94	3.99	4.17	4.99
	2	9.74	6.03	5.69	4.92	4.95	5.27	6.28
	3	10.40	6.19	5.87	5.13	5.06	5.56	6.73
2000 mg/kg B	1	4.91	6.31	5.99	7.09	6.66	4.89	6.06
	2	4.29	5.66	5.15	6.12	5.81	4.03	4.87
	3	3.80	5.03	4.86	5.78	5.53	4.08	5.07
5000 mg/kg	1	6.43	6.79	5.37	4.20	5.22	5.24	6.22
	2	5.45	5.71	4.46	3.54	4.49	4.46	5.42
	3	6.12	6.49	5.17	4.25	5.30	5.30	6.36



**Lampiran 1. (Lanjutan)**

Tabel 16. Persentase perubahan berat badan mencit putih betina selama 14 hari

Kelompok	No hewan	% Perubahan BB						
		Hari ke 2	Hari ke 4	hari ke 6	hari ke 8	hari ke 10	hari ke 12	hari ke 14
Kontrol	1	4.55	8.26	7.44	5.79	7.02	6.61	4.96
	2	6.30	5.91	5.51	5.12	4.33	7.09	7.09
	3	2.00	4.00	1.50	2.50	4.50	2.00	1.00
300 mg/kg A	1	1.42	1.07	3.91	5.34	5.69	1.78	1.42
	2	-2.61	-1.74	0.87	2.17	2.61	1.30	-0.43
	3	1.14	7.20	6.06	5.68	4.55	4.17	6.06
300 mg/kg B	1	6.77	7.57	6.37	3.98	5.18	3.98	2.79
	2	4.26	5.53	5.11	6.38	8.09	6.38	6.38
	3	2.71	2.71	0.45	-0.45	2.71	0.45	1.81
2000 mg/kg A	1	3.14	1.18	1.18	0.78	1.18	-2.35	3.14
	2	1.35	2.24	7.17	8.97	6.73	8.97	12.11
	3	-4.12	-6.58	-8.64	-9.47	-7.00	-7.82	-8.64
2000 mg/kg B	1	3.83	0.00	4.21	3.83	2.30	6.13	5.75
	2	2.94	1.96	3.43	3.43	3.92	3.43	3.43
	3	0.42	-0.85	-0.85	-0.85	-1.27	-3.39	-5.93
5000 mg/kg	1	-2.69	-1.92	-3.85	-3.46	-1.15	-2.31	-3.08
	2	-0.79	1.98	0.40	3.95	1.58	2.37	9.49
	3	-11.36	-5.00	-5.45	-8.64	-9.09	-6.82	-9.55



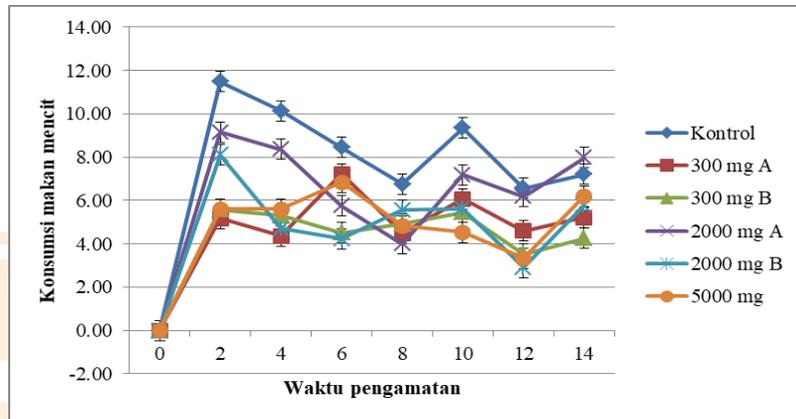
### Lampiran 1. (Lanjutan)

Tabel 17. Persen rasio bobot organ mencit putih betina

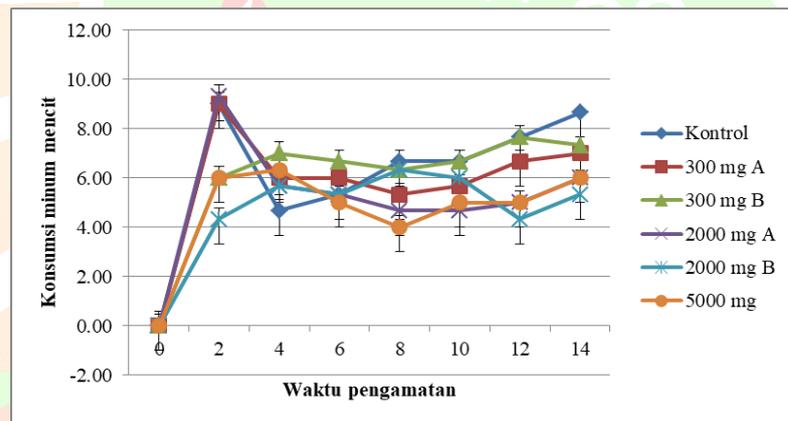
Kelompok	No hewan	% Rasio hati	% Rasio ginjal	% rasio jantung
Kontrol	1	5.03	1.00	0.39
	2	4.28	1.04	0.53
	3	5.48	0.92	0.42
300 mg/kg A	1	4.47	0.88	0.40
	2	4.92	1.11	0.52
	3	6.13	1.17	0.74
300 mg/kg B	1	5.00	1.14	0.47
	2	4.86	1.07	0.47
	3	3.55	0.93	0.39
2000 mg/kg A	1	4.88	1.13	0.44
	2	5.28	1.05	0.57
	3	5.09	1.06	0.51
2000 mg/kg B	1	4.30	0.86	0.43
	2	4.55	1.03	0.46
	3	5.48	1.02	0.40
5000 mg/kg	1	4.79	1.00	0.48
	2	5.90	1.09	0.53
	3	5.23	1.17	0.62



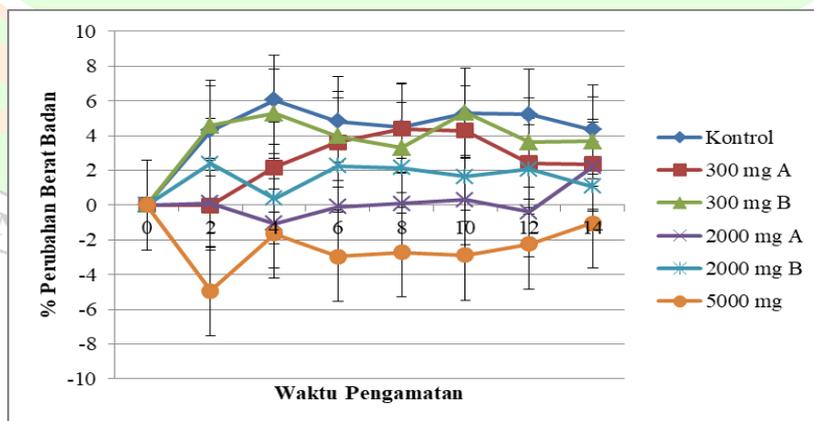
Lampiran 1. (Lanjutan)



Gambar 4. Jumlah komsumsi makan mencit putih betina selama 14 hari



Gambar 5. Jumlah komsumsi minum mencit putih betina selama 14 hari



Gambar 6. Persentase perubahan berat badan mencit putih betina selama 14 hari

## Lampiran 2. Data Perhitungan Statistik

Tabel 18. Hasil uji normalitas jumlah konsumsi makan mencit terhadap kelompok perlakuan

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Kelompok uji	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Komsumsi makan mencit	Kontrol	.120	21	.200 <sup>*</sup>	.966	21	.650
	Uji 300 mg/kg A	.145	21	.200 <sup>*</sup>	.932	21	.150
	Uji 300 mg/kg B	.108	21	.200 <sup>*</sup>	.961	21	.534
	Uji 2000 mg/kg A	.103	21	.200 <sup>*</sup>	.973	21	.792
	Uji 2000 mg/kg B	.161	21	.166	.961	21	.538
	Uji 5000 mg/kg	.114	21	.200 <sup>*</sup>	.941	21	.224

Tabel 19. Hasil uji normalitas jumlah konsumsi makan mencit terhadap waktu pengamatan

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Waktu pengamatan	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Komsumsi makan mencit	hari ke 2	.190	18	.084	.927	18	.173
	hari ke 4	.180	18	.125	.879	18	.025
	hari ke 6	.137	18	.200 <sup>*</sup>	.929	18	.185
	hari ke 8	.123	18	.200 <sup>*</sup>	.937	18	.255
	hari ke 10	.146	18	.200 <sup>*</sup>	.919	18	.123
	hari ke 12	.179	18	.134	.917	18	.115
	hari ke 14	.132	18	.200 <sup>*</sup>	.954	18	.485

## Lampiran 2. (Lanjutan)

Tabel 20. Hasil perhitungan statistik ANOVA dua arah terhadap jumlah konsumsi makan mencit

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Komsumsi makan mencit

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	458.959 <sup>a</sup>	41	11.194	16.718	.000
Intercept	4648.068	1	4648.068	6941.588	.000
Kelompok	211.841	5	42.368	63.274	.000
Waktu	105.450	6	17.575	26.247	.000
Kelompok * Waktu	141.668	30	4.722	7.052	.000
Error	56.246	84	.670		
Total	5163.273	126			
Corrected Total	515.205	125			

Uji lanjut jarak berganda Duncan :

Tabel 21. Hasil uji lanjut jarak berganda duncan terhadap jumlah konsumsi makan mencit dari faktor perlakuan/dosis

**Konsumsi makan mencit**

Duncan<sup>a,b</sup>

Kelompok uji	N	Subset			
		1	2	3	4
Uji 300 mg/kg B	21	4.7953			
Uji 2000 mg/kg B	21	5.2719	5.2719		
Uji 300 mg/kg A	21	5.3038	5.3038		
Uji 5000 mg/kg	21		5.5657		
Uji 2000 mg/kg A	21			6.9395	
Kontrol	21				8.5657
Sig.		.059	.278	1.000	1.000

## Lampiran 2. (Lanjutan)

Tabel 22. Hasil uji lanjut jarak berganda duncan terhadap jumlah konsumsi makan mencit dari faktor waktu pengamatan

Komsumsi makan mencit					
Duncan <sup>a,b</sup>					
Waktu pengamatan	N	Subset			
		1	2	3	4
hari ke 12	18	4.5189			
hari ke 8	18		5.0894		
hari ke 14	18			6.1046	
hari ke 10	18			6.3706	
hari ke 4	18			6.4089	
hari ke 6	18			6.5061	
hari ke 2	18				7.5172
Sig.		1.000	1.000	.185	1.000

Tabel 23. Hasil uji normalitas jumlah konsumsi minum mencit terhadap kelompok perlakuan

Tests of Normality							
	Kelompok uji	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Konsumsi minum mencit	Kontrol	.087	20	.200 <sup>*</sup>	.972	20	.799
	Uji 300 mg/kg A	.162	21	.156	.921	21	.092
	Uji 300 mg/kg B	.133	21	.200 <sup>*</sup>	.952	21	.370
	Uji 2000 mg/kg A	.155	20	.200 <sup>*</sup>	.868	20	.011
	Uji 2000 mg/kg B	.106	21	.200 <sup>*</sup>	.974	21	.828
	Uji 5000 mg/kg	.140	21	.200 <sup>*</sup>	.959	21	.490

## Lampiran 2. (Lanjutan)

Tabel 24. Hasil uji normalitas konsumsi minum mencit terhadap waku pengamatan

Tests of Normality							
	Waktu pengamatan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Konsumsi minum mencit	hari ke 2	.120	16	.200 <sup>*</sup>	.934	16	.282
	hari ke 4	.111	18	.200 <sup>*</sup>	.972	18	.829
	hari ke 6	.158	18	.200 <sup>*</sup>	.944	18	.342
	hari ke 8	.123	18	.200 <sup>*</sup>	.956	18	.531
	hari ke 10	.126	18	.200 <sup>*</sup>	.964	18	.674
	hari ke 12	.133	18	.200 <sup>*</sup>	.930	18	.195
	hari ke 14	.162	18	.200 <sup>*</sup>	.947	18	.382

Tabel 25. Hasil perhitungan statistik ANOVA dua arah terhadap jumlah konsumsi minum mencit

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Konsumsi minum mencit					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	184.802 <sup>a</sup>	41	4.507	6.910	.000
Intercept	4610.281	1	4610.281	7067.558	.000
Kelompok	57.236	5	11.447	17.549	.000
Waktu	39.216	6	6.536	10.020	.000
Kelompok * Waktu	95.211	30	3.174	4.865	.000
Error	53.490	82	.652		
Total	4812.282	124			
Corrected Total	238.292	123			

## Lampiran 2. (Lanjutan)

Uji lanjut jarak berganda Duncan :

Tabel 26. Hasil uji lanjut jarak berganda duncan terhadap jumlah konsumsi minum mencit dari faktor perlakuan/dosis

**Konsumsi minum mencit**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

Kelompok uji	N	Subset	
		1	2
Uji 2000 mg/kg B	21	5.3329	
Uji 5000 mg/kg	21	5.3329	
Uji 2000 mg/kg A	20	5.5795	
Uji 300 mg/kg A	21		6.5243
Uji 300 mg/kg B	21		6.8090
Kontrol	20		6.8770
Sig.		.360	.190

Tabel 27. Hasil uji lanjut jarak berganda duncan terhadap jumlah konsumsi minum mencit dari faktor waktu pengamatan

**Konsumsi minum mencit**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

Waktu pengamatan	N	Subset	
		1	2
hari ke 8	18	5.5539	
hari ke 6	18	5.6106	
hari ke 10	18	5.7789	
hari ke 4	18	5.8878	
hari ke 12	18	6.0556	
hari ke 14	18		6.7222
hari ke 2	16		7.0094
Sig.		.104	.294

## Lampiran 2. (Lanjutan)

Tabel 28. Hasil uji normalitas persen perubahan berat badan mencit terhadap kelompok perlakuan

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Kelompok uji	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Persen	Kontrol	.112	21	.200 <sup>+</sup>	.945	21	.269
Perubahan	Uji 300 mg/kg A	.116	21	.200 <sup>+</sup>	.954	21	.399
BB	Uji 300 mg/kg B	.141	21	.200 <sup>+</sup>	.954	21	.399
	Uji 2000 mg/kg A	.176	21	.089	.948	21	.309
	Uji 2000 mg/kg B	.158	21	.182	.931	21	.144
	Uji 5000 mg/kg	.074	21	.200 <sup>+</sup>	.979	21	.917

Tabel 29. Hasil uji normalitas persen perubahan berat badan mencit terhadap waktu pengamatan

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Waktu pengamatan	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Persen	hari ke 2	.173	18	.161	.895	18	.048
Perubahan BB	hari ke 4	.091	18	.200 <sup>+</sup>	.969	18	.771
	hari ke 6	.118	18	.200 <sup>+</sup>	.944	18	.337
	hari ke 8	.185	18	.107	.882	18	.028
	hari ke 10	.179	18	.133	.880	18	.026
	hari ke 12	.131	18	.200 <sup>+</sup>	.952	18	.452
	hari ke 14	.148	18	.200 <sup>+</sup>	.954	18	.485



## Lampiran 2. (Lanjutan)

Tabel 30. Hasil perhitungan statistik ANOVA dua arah terhadap persen perubahan berat badan mencit

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Persen Perubahan BB

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	929.292 <sup>a</sup>	41	22.666	1.136	.307
Intercept	469.106	1	469.106	23.511	.000
Kelompok	790.143	5	158.029	7.920	.000
Waktu	22.988	6	3.831	.192	.978
Kelompok * Waktu	116.162	30	3.872	.194	1.000
Error	1676.033	84	19.953		
Total	3074.431	126			
Corrected Total	2605.325	125			

Tabel 31. Hasil uji lanjut jarak berganda duncan terhadap persen perubahan berat badan mencit dari faktor perlakuan/dosis

**Persen Perubahan BB**

Duncan<sup>a,b</sup>

Kelompok uji	N	Subset			
		1	2	3	4
Uji 5000 mg/kg	21	-2.6376			
Uji 2000 mg/kg A	21		.6352		
Uji 2000 mg/kg B	21		1.6605	1.6605	
Uji 300 mg/kg A	21		2.7457	2.7457	2.7457
Uji 300 mg/kg B	21			4.2457	4.2457
Kontrol	21				4.9276
Sig.		1.000	.152	.079	.139

## Lampiran 2. (Lanjutan)

Tabel 32. Hasil uji normalitas persen rasio bobot organ

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Kelompok uji	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
% Rasio bobot organ hati	kontrol	.232	3	.	.980	3	.728
	Uji 300 mg/kg A	.282	3	.	.935	3	.509
	Uji 300 mg/kg B	.354	3	.	.821	3	.165
	Uji 2000 mg/kg A	.181	3	.	.999	3	.943
	Uji 2000 mg/kg B	.308	3	.	.901	3	.390
	Uji 5000 mg/kg	.223	3	.	.985	3	.767
% Rasio bobot organ ginjal	kontrol	.232	3	.	.980	3	.726
	Uji 300 mg/kg A	.305	3	.	.906	3	.404
	Uji 300 mg/kg B	.244	3	.	.971	3	.675
	Uji 2000 mg/kg A	.303	3	.	.909	3	.415
	Uji 2000 mg/kg B	.374	3	.	.776	3	.059
	Uji 5000 mg/kg	.187	3	.	.998	3	.914
% Rasio bobot organ jantung	kontrol	.290	3	.	.926	3	.474
	Uji 300 mg/kg A	.236	3	.	.977	3	.708
	Uji 300 mg/kg B	.370	3	.	.786	3	.081
	Uji 2000 mg/kg A	.191	3	.	.997	3	.898
	Uji 2000 mg/kg B	.176	3	.	1.000	3	.981
	Uji 5000 mg/kg	.227	3	.	.983	3	.749



## Lampiran 2. (Lanjutan)

Tabel 33. Hasil perhitungan statistik ANOVA satu arah terhadap persen rasio bobot organ

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
% Rasio bobot organ hati	Between Groups	1.363	5	.273	.659	.661
	Within Groups	4.961	12	.413		
	Total	6.324	17			
% Rasio bobot organ ginjal	Between Groups	.037	5	.007	.788	.578
	Within Groups	.114	12	.009		
	Total	.151	17			
% Rasio bobot organ jantung	Between Groups	.045	5	.009	1.129	.396
	Within Groups	.095	12	.008		
	Total	.139	17			



### Lampiran 3. Data Penunjang

	<b>HERBARIUM UNIVERSITAS ANDALAS (ANDA)</b> Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas Kampus Limau Manih Padang Sumbar Indonesia 25163 Telp. +62-751-777427 ext. *811 e-mail: <a href="mailto:nas_herb@yahoo.com">nas_herb@yahoo.com</a> ; <a href="mailto:herbariumandaunand@gmail.com">herbariumandaunand@gmail.com</a>						
Nomor	: 004/K-ID/ANDA/I/2020						
Lampiran	: -						
Perihal	: Hasil Identifikasi						
Kepada yth, Nevi Syafitri 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	: Nevi Syafitri						
No. BP	: 1611011056						
Instansi	: Fakultas Farmasi UNAND						
Berikut ini diberikan hasil identifikasi yang dikeluarkan dari Herbarium Universitas Andalas.							
<table border="1"><thead><tr><th>No</th><th>Family</th><th>Spesies</th></tr></thead><tbody><tr><td>1.</td><td>Myrtaceae</td><td><i>Eugenia uniflora</i> L.</td></tr></tbody></table>	No	Family	Spesies	1.	Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L.	
No	Family	Spesies					
1.	Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L.					
Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.							
 <p>Padang, 6 Januari 2020 Kepala Dr. Murainas, M.Si NIP. 196908141995122001</p>							

Gambar 7. Hasil identifikasi tumbuhan

### Lampiran 3. (Lanjutan)



**KOMITE ETIKA PENELITIAN**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS ANDALAS**  
Jl. Perintis Kemerdekaan Padang 25127  
Telepon: 0751 31746 Fax : 0751 32838 No. Reg : 036/KNEP/2008  
e-mail: [fk2unand@pdg.vision.net.id](mailto:fk2unand@pdg.vision.net.id)

---

No: 172/KEP/FK/2020

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK**  
**ETHICAL CLEARANCE**

Tim Komite Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang, dalam upaya melindungi hak azazi dan kesejahteraan subjek penelitian kedokteran/kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian dengan judul:  
*The Committee of the Research Ethics of the Faculty of Medicine, Andalas University, with regards of the protection of human rights and welfare in medical/health research, has carefully reviewed the research protocol entitled:*

**“Uji Toksisitas Akut dan Toksisitas Tertunda dari Ekstrak Etanol Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) pada mencit Putih Betina”**

Nama Peneliti Utama : Nevi Syafitri  
*Name of the Investigator*

Nama Institusi : Fakultas Farmasi Universitas Andalas  
*Name of Institution*

dan telah menyetujui protokol penelitian tersebut diatas.  
*and recommended the above research protocol.*

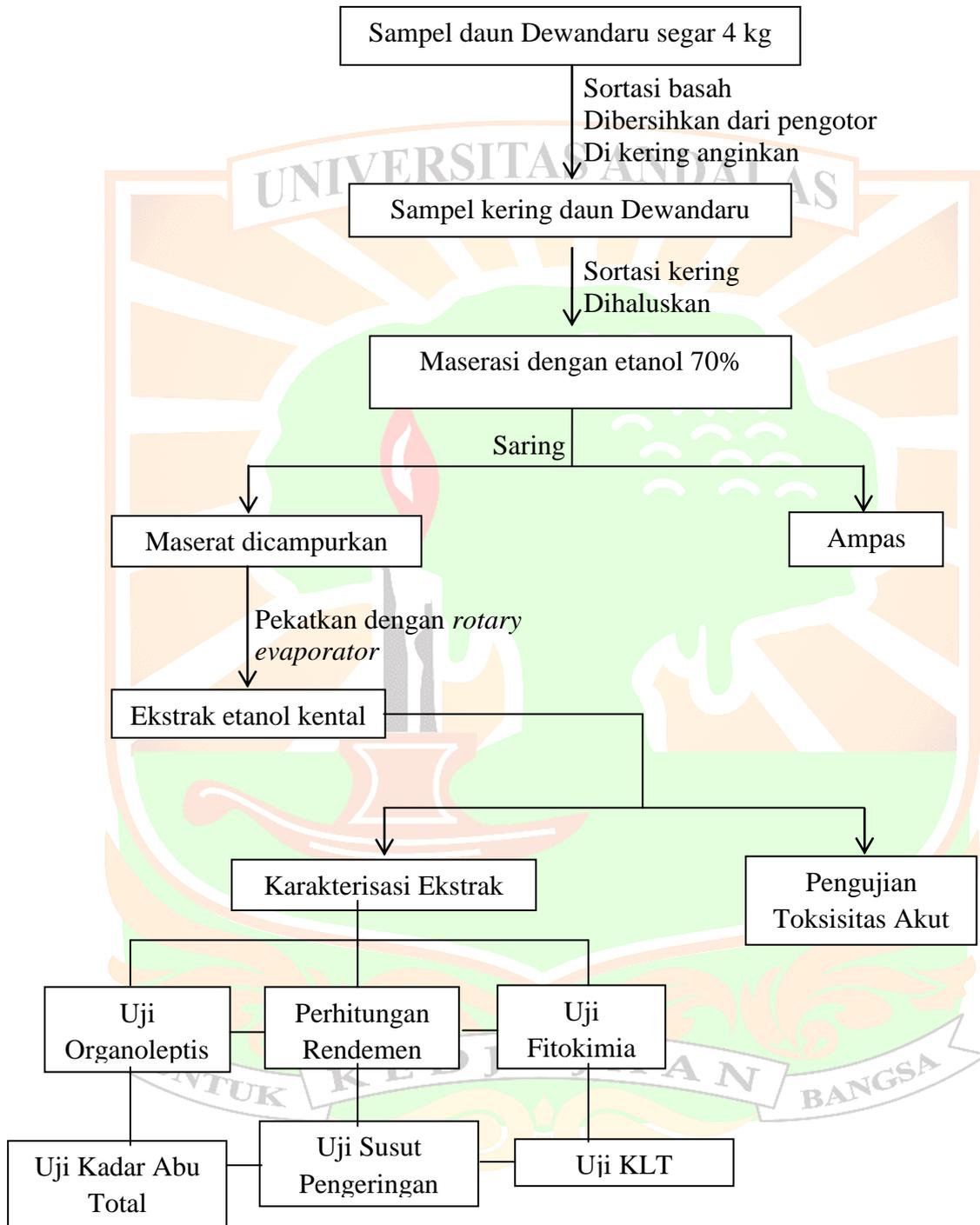
Padang, 05 Maret 2020

Ketua  
*Chairperson*

  
  
Prof. Dr. Ir. Eryati Darwin, PA(K)  
NIP: 1953 1109 1982 112 001

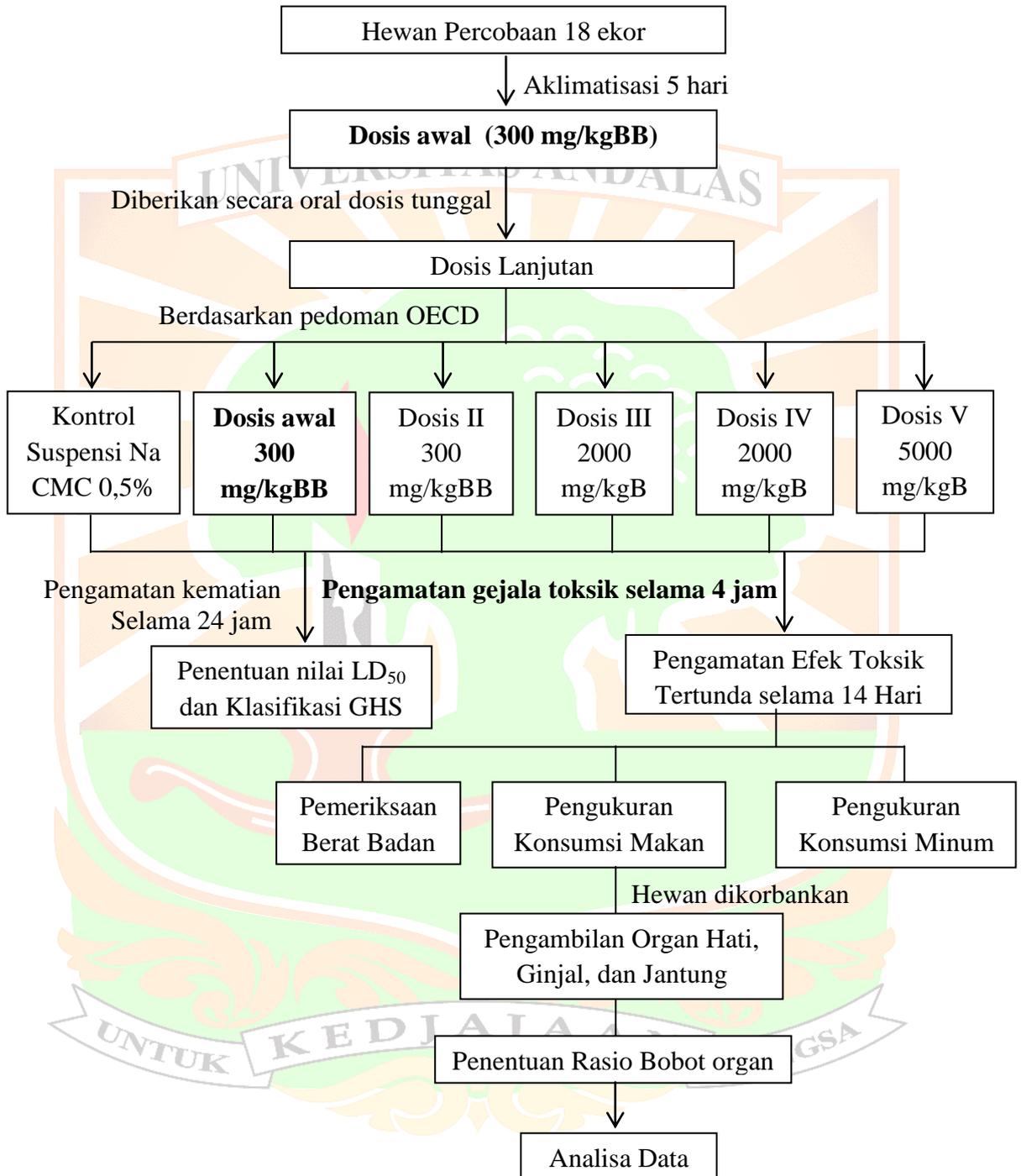
Gambar 8. Hasil uji kode etik

Lampiran 3. (Lanjutan)



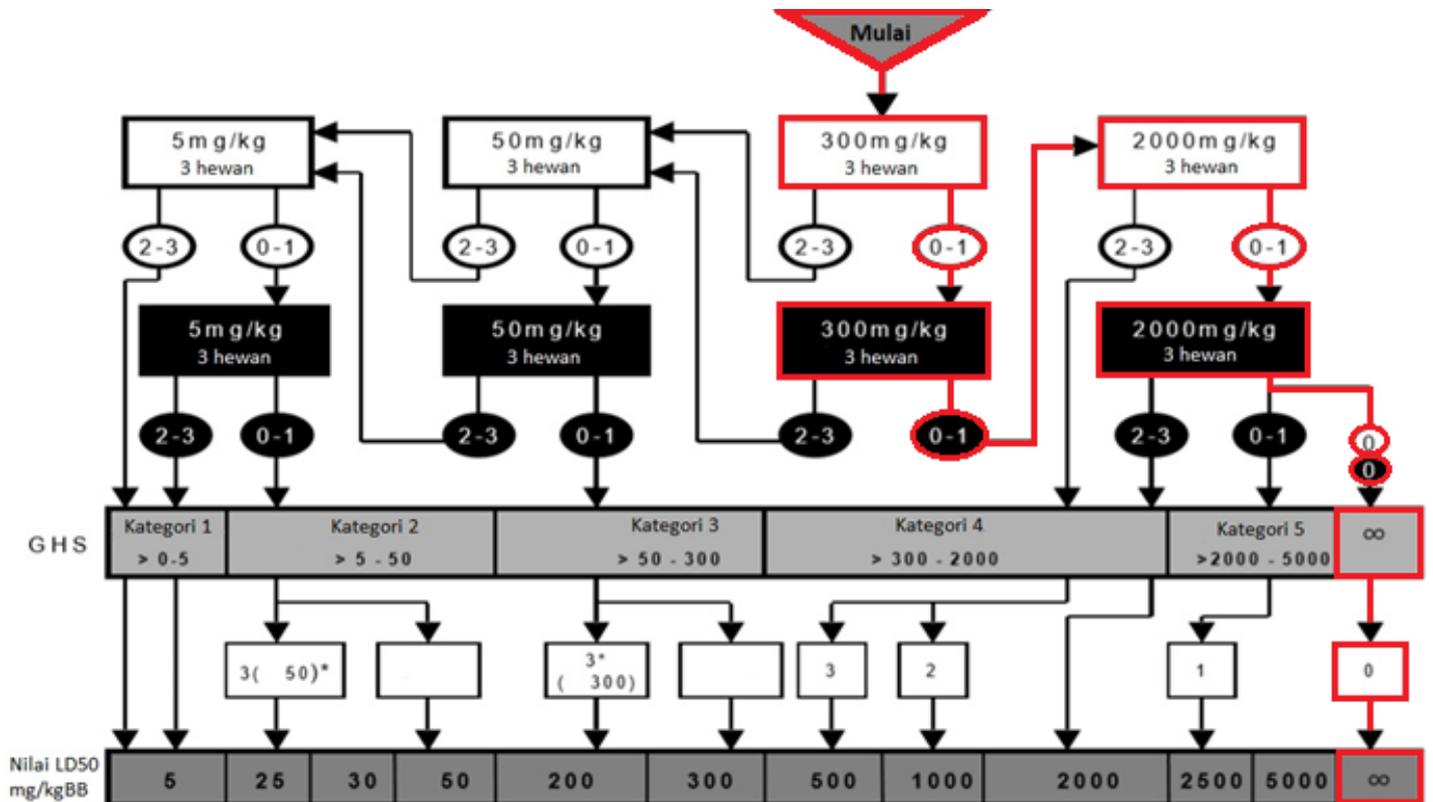
Gambar 9. Skema kerja pembuatan ekstrak etanol daun dewandaru

Lampiran 3. (Lanjutan)



Gambar 10. Skema kerja pengujian toksisitas akut dan tertunda ekstrak daun dewandaru

### Lampiran 3. (Lanjutan)



Gambar 11. Skema kerja pengujian toksisitas akut berdasarkan OECD 423

#### Keterangan :

GHS : *Globally Harmonised Classification System*

\* : pengujian pertama

∞ : *unclassified*

0, 1, 2, 3 : jumlah kematian setiap pengujian

Pengujian untuk dosis 5000 mg/kg/kgBB hanya satu langkah (yaitu 3 hewan percobaan). Jika hewan pertama mati, kemudian dilanjutkan pada dosis awal 2000 mg/kg/kgBB. Jika hewan pertama bertahan, dua hewan selanjutnya diberi dosis. Jika hanya satu dari ketiga hewan yang mati, maka LD50 >5000 mg/kg. Jika kedua binatang mati, maka dilanjutkan pada dosis awal 2000 mg/kg.

### Lampiran 3. (Lanjutan)



Gambar 12. Pengerinan simplisia



Gambar 13. Suspensi sediaan uji



Gambar 14. Uji fitokimia (alkaloid, fenolik, saponin, flavonoid)

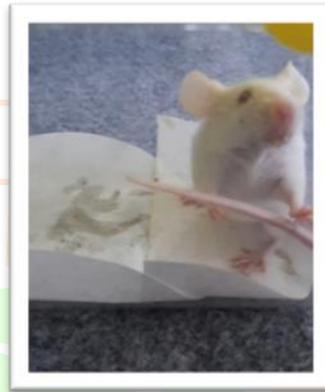
Keterangan :

- A. Uji alkaloid (dragendorf)
- B. Uji alkaloid (mayer)
- C. Uji fenolik
- D. Uji saponin
- E. Uji flavonoid

**Lampiran 3. (Lanjutan)**



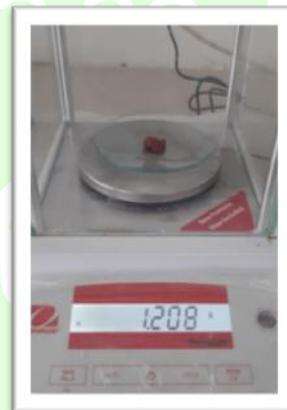
Gambar 15. Ekstrak daun dewandaru



Gambar 16. Pengamatan gejala toksik



Gambar 17. Pembedahan hewan



Gambar 18. Penimbangan organ

UNTUK KEDJAJAAN BANGSA