



**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL DAUN
KEMANGI (*Ocimum sanctum*) BERDASARKAN
NILAI LD₅₀ DAN HISTOPATOLOGI GINJAL**

SKRIPSI

Oleh
Khana Nurfadhila
NIM 142010101034

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL DAUN
KEMANGI (*Ocimum sanctum*) BERDASARKAN
NILAI LD₅₀ DAN HISTOPATOLOGI GINJAL**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Kedokteran (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh
Khana Nurfadhila
NIM 142010101034

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Orang tua saya tercinta, Drs. H. Baidowi Noor dan Hj. Andjar Sulandari, MM.Kes yang selalu memberikan kasih sayang, doa tiada henti, serta pengorbanan yang dilakukan setiap waktu;
2. Kakak saya M. Fandhy Hakim dan Maria Ulfa Widuri yang memberikan dukungan moral;
3. Para guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya hingga menjadi manusia yang berilmu;
4. Keluarga besar angkatan 2014 Elixir Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTTO

Barangsiapa yang berjihad (bersungguh-sungguh), sesungguhnya jihadnya itu adalah untuk dirinya sendiri. (terjemahan surat Al-Ankabut ayat 6)*)

Allah akan mengangkat derajat orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu beberapa derajat.
(terjemahan Surat Al-Mujadalah ayat 11)**)

*) **) Syaamil Quran. 2010. Hijaz Terjemah Tafsir Per Kata. Bandung: Syaamil Quran

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Khana Nurfadhila

NIM :142010101034

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) Berdasarkan Nilai LD₅₀ dan Histopatologi Ginjal” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 2 Januari 2018

Yang menyatakan,

Khana Nurfadhila
NIM. 142010101034

SKRIPSI

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI
(*Ocimum sanctum*) BERDASARKAN NILAI LD₅₀ DAN HISTOPATOLOGI
GINJAL**

Oleh

Khana Nurfadhila
NIM 142010101034

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Cholis Abrori, M.Kes., M.Pd.Ked.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) Berdasarkan Nilai LD₅₀ dan Histopatologi Ginjal” karya Khana Nurfadhila telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : 2 Januari 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I

dr. Al Munawir, M.Kes., Ph.D
NIP 19690901 199901 1 003

dr. Edy Junaidi, M.Sc
NIP 19750801 200312 1 003

Anggota II,

Anggota III,

dr. Cholis Abrori, M.Kes., M.Pd.Ked
NIP 19710521 199803 1 003

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si
NIP 19840916 200801 2 003

Mengesahkan,

Dekan

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) Berdasarkan Nilai LD₅₀ dan Histopatologi Ginjal; Khana Nurfadhila, 142010101034; 2017: 81 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penggunaan tanaman sebagai obat diyakini oleh banyak masyarakat Indonesia salah satunya adalah daun kemangi (*Ocimum sanctum*). Kemangi termasuk dalam famili Lamiaceae yang populer dalam tanaman obat dan memiliki banyak kandungan antioksidan dan fitonutrien. Meskipun ekstrak daun kemangi telah terbukti banyak manfaat, pada dosis tertentu suatu senyawa tetap memiliki probabilitas dalam menyebabkan toksisitas dalam tubuh. Uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui berapa takaran senyawa yang dapat menyebabkan efek toksik dalam tubuh dan dapat dilihat secara mikroskopik pada organ vital seperti ginjal yang merupakan tempat ekskresi senyawa asing seperti obat atau senyawa toksin yang masuk dalam tubuh. Sejauh ini belum terdapat pengujian toksisitas akut oral pada ekstrak etanol 70% daun kemangi (*Ocimum sanctum*) pada mencit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas akut ekstrak etanol daun kemangi Berdasarkan nilai kisaran LD₅₀ dan gambaran histopatologi ginjal mencit.

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental* dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Uji toksisitas akut oral dilakukan dengan metode OECD 420 *fix dose procedure* yang mempunyai 3 tahap uji yakni uji pendahuluan, uji utama, dan uji pembatasan. Uji pendahuluan bertujuan untuk mencari dosis awal untuk uji utama. Dosis awal pada uji pendahuluan dapat dipilih dari tingkatan *fix dose*: 5, 50, 300 dan 2000 mg/KgBB ekstrak etanol daun kemangi yang dapat diturunkan atau dinaikkan sesuai kematian hewan uji. Hewan uji yang digunakan adalah 1 ekor mencit Balb/c dengan interval waktu pengamatan 24 jam pada setiap dosis dan semua hewan harus diamati selama 14 hari. Selanjutnya dilakukan uji utama dengan dosis 2000 mg/KgBB ekstrak (yang didapatkan dari uji pendahuluan) dan kelompok kontrol yang diberikan tween 80 sebanyak 0,01mL/20

gram mencit dengan masing-masing kelompok 5 ekor mencit Balb/c. Pengamatan dilakukan pada 30 menit pertama, 4 jam pertama selama 24 jam dan sehari sekali selama 14 hari. Bukti toksisitas yang dinilai berupa perubahan aktivitas otonom hewan uji seperti berjalan menggunakan perut yang mengindikasikan bahwa hewan uji merasa sangat nyeri, diare dapat berupa feses yang berair atau berdarah, *discharge* dari hidung, menyiksa diri sendiri dengan membenturkan kepala ke kandang atau tidak dapat mencapai air atau makanan, perdarahan di orifisium atau tidak ada sama sekali kematian hewan uji. Pada uji utama apabila tidak terdapat ≥ 1 bukti toksisitas dan/atau ≤ 1 kematian hewan uji maka tidak dapat langsung ditentukan kisaran nilai LD₅₀. Selain itu, apabila tidak terdapat ≥ 2 hewan uji dan tidak terbukti adanya bukti toksisitas maka termasuk kategori *unclassified* GHS. Setelah 14 hari pengamatan, hewan dikorbankan dan diambil organ ginjal untuk dilakukan pengamatan histopatologi dengan pewarnaan hematoksilin dan eosin. Kemudian dilakukan analisis data dengan uji nonparametrik *Mann-Whitney*.

Hasil penelitian didapatkan kisaran nilai LD₅₀ ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) >2000 mg/KgBB. Uji *Mann-Whitney* menghasilkan nilai signifikansi sebesar $p=0,018$ ($p<0,05$). *Power analysis* menunjukkan hasil yang kurang kuat maka pembuktian perbedaan antar kelompok berdasarkan data yang dimiliki peneliti tidak adekuat.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) Berdasarkan Nilai LD₅₀ dan Histopatologi Ginjal”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

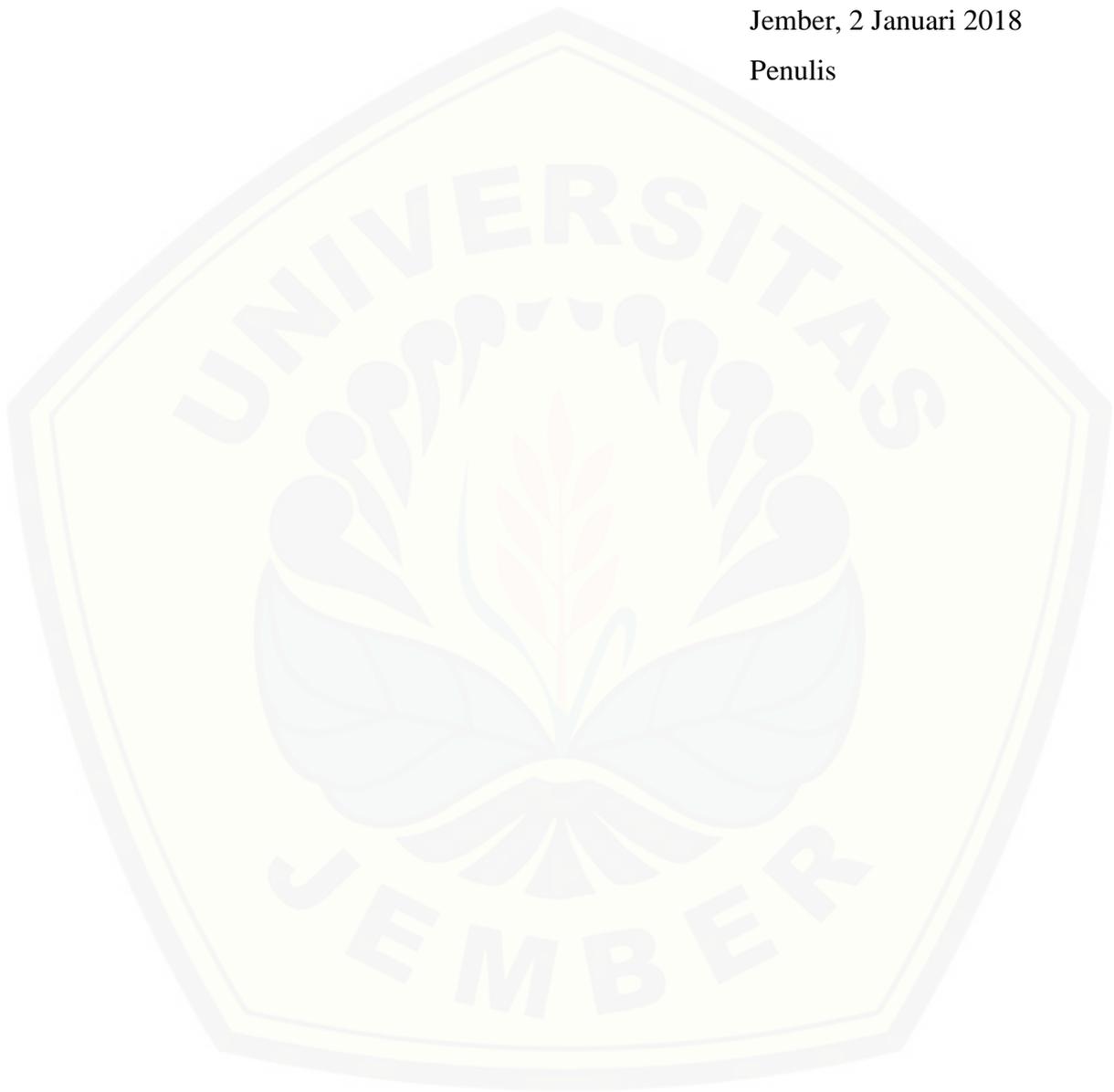
Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Cholis Abrori, M.Kes., M.Pd.Ked selaku dosen pembimbing utama dan dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga dalam proses penyusunan skripsi ini;
3. Orang tua saya tercinta, Drs. H. Baidowi Noor dan Hj. Andjar Sulandari, MM.Kes yang selalu memberikan kasih sayang, doa tiada henti, serta pengorbanan yang dilakukan setiap waktu;
4. Kakak saya M. Fandhy Hakim dan Maria Ulfa Widuri yang senantiasa memberikan dukungan moral;
5. Sahabat-sahabat saya Hafid Aji Prasetyo, Richard Juliano, Nastiti Bekti Utami, Sheillavi Fauziah Alex, Sastika Herdiyanti, Nikmatul Maula, Nur Ulfiatus, dan Dirga Rimbawan yang telah memberikan dukungan dan motivasi dalam penyelesaian skripsi ini;
6. Analis Laboratorium Farmakologi dan Fisiologi Lilik Maslian, Amd.;
7. Keluarga besar angkatan 2014 Elixir Fakultas Kedokteran Universitas jember;
8. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 2 Januari 2018

Penulis



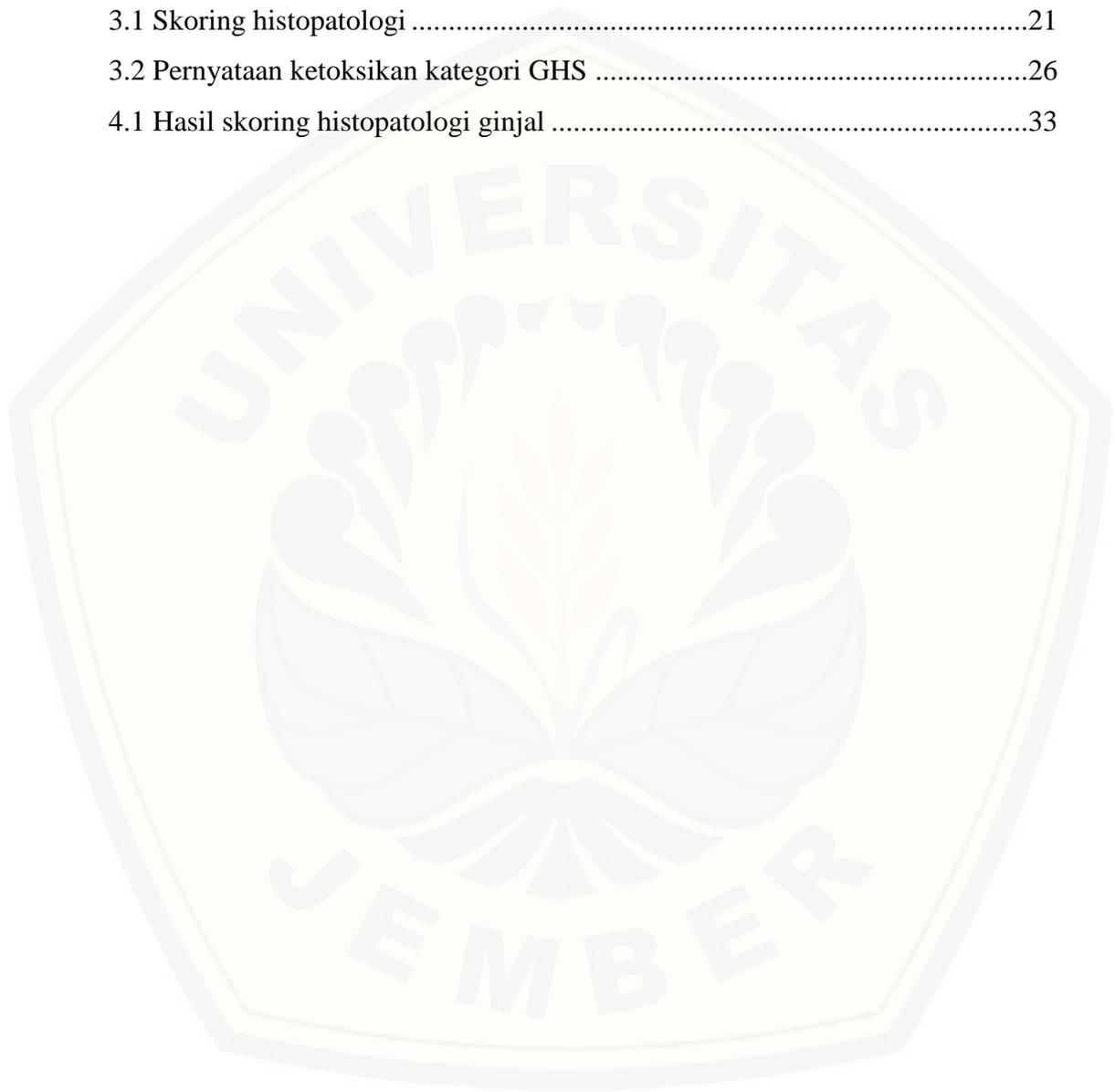
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tinjauan Kemangi	4
2.1.1 Definisi Kemangi.....	4
2.1.2 Taksonomi Kemangi	4
2.1.3 Manfaat Kemangi	5
2.1.4. Kandungan dan Efek Farmakologi Kemangi	7
2.2 Antioksidan dan Prooksidan	7
2.3 Tinjauan Toksikologi	8
2.4 Uji Toksisitas Akut	9
2.5 Uji Toksisitas Akut Oral Metode 420	11
2.6 Ginjal	12
2.6.1 Anatomi Ginjal	12
2.6.2 Histologi Ginjal	13
2.6.3 Histopatologi Ginjal	14
2.7 Kerangka Konseptual Penelitian	16
2.8 Hipotesis Penelitian	17
BAB 3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Jenis Penelitian	18
3.2 Rancangan Penelitian	18
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.4 Variabel Penelitian	19
3.5 Definisi Operasional	20
3.5.1 Ekstrak Etanol Daun Kemangi	20

3.5.2 Dosis Bertingkat	20
3.5.3 Jumlah Kematian Hewan Uji.....	20
3.5.4 Pengamatan Histopatologi Ginjal	21
3.6 Alat Dan Bahan Penelitian	21
3.6.1 Alat Penelitian	21
3.6.2 Bahan Penelitian	22
3.7 Prosedur Penelitian	22
3.7.1 Pemilihan Hewan Uji	22
3.7.2 Adaptasi Hewan Uji	22
3.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kemangi (<i>Ocimum Sanctum</i>)	23
3.7.4 Pembuatan Sediaan Ekstrak Etanol Daun Kemangi.....	23
3.7.5 Uji Toksisitas Akut.....	25
3.7.6 Pembuatan Preparat	27
3.7.7 Pengamatan Efek Toksisitas Akut Pada Histopatologi Ginjal	28
3.8 Analisis Data	28
3.9 Alur Penelitian	29
3.10 Uji Kelayakan Etik	30
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Hasil	31
4.1.1 Hasil Ekstrak Etanol Daun Kemangi	31
4.1.2 Penentuan Nilai LD ₅₀ dengan Metode OECD 420.....	31
4.1.3 Hasil Pengamatan Histopatologi Ginjal	32
4.2 Pembahasan	33
BAB 5. PENUTUP	37
5.1 Kesimpulan	37
5.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	43

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Penggolongan sediaan uji menurut GHS	11
3.1 Skoring histopatologi	21
3.2 Pernyataan ketoksikan kategori GHS	26
4.1 Hasil skoring histopatologi ginjal	33



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Daun kemangi	4
2.2 Reaksi fenton.....	8
2.3 Korteks dan medula ginjal perbesaran lemah	14
2.4 Nekrosis tubular akut	15
2.5 Nekrosis tubular akut dengan dilatasi lumen tubulus	15
2.6 Kerangka konseptual penelitian	16
3.1 Skema rancangan penelitian.....	19
3.2 Skema penentuan dosis uji pendahuluan OECD 420.....	25
3.3 Skema alur penelitian	29
4.1 Hasil histopatologi ginjal perbesaran 400 kali	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Lembar persetujuan etik	43
Lampiran A.1a Halaman pertama lembar persetujuan etik	43
Lampiran A.1b Halaman kedua lembar persetujuan etik.....	44
Lampiran B. Surat identifikasi tanaman kemangi	45
Lampiran B.1a halaman pertama surat identifikasi tanaman kemangi	45
Lampiran B.1b halaman kedua surat identifikasi tanaman kemangi .	46
Lampiran B.1c halaman ketiga surat identifikasi tanaman kemanagi	47
Lampiran C. Tabel dosis pemberian ekstrak.....	48
Lampiran D. Protokol pembuatan preparat dengan pewarnaan H&E.....	49
Lampiran E. Data penelitian.....	51
Lampiran E.1 Pengamatan bukti toksisitas.....	51
Lampiran E.2 Skoring histopatologi ginjal blind 1	56
Lampiran E.3 Skoring histopatologi ginjal blind 2.....	57
Lampiran F. Analisis data	59
Lampiran G. Dokumentasi penelitian	61

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan tanaman sebagai obat diyakini oleh banyak masyarakat di Indonesia. Banyaknya penduduk Indonesia menganggap obat yang berasal dari tanaman sangat bermanfaat dan sama sekali tidak berbahaya untuk dikonsumsi. Disamping itu, tanaman obat merupakan bagian dari budaya bangsa yang banyak dimanfaatkan masyarakat sejak berabad-abad lalu dan Indonesia pun merupakan mega-center tanaman obat di dunia (Depkes RI, 2007). Data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2010 menunjukkan persentase penduduk Indonesia yang pernah mengkonsumsi ramuan dari tanaman obat atau jamu sebanyak 59,12 persen yang terdapat pada semua kelompok umur, laki-laki dan perempuan, baik di perdesaan maupun perkotaan, 95,60 persen penduduk Indonesia yang pernah mengkonsumsi jamu menyatakan bahwa konsumsi jamu bermanfaat bagi tubuh (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan kementerian kesehatan RI, 2010).

Penggunaan tanaman obat di Indonesia sangatlah banyak, salah satunya adalah daun kemangi (*Ocimum sanctum*). Kemangi termasuk dalam famili *Lamiaceae* yang populer dalam tanaman obat dan memiliki banyak kandungan antioksidan dan fitonutrien. Daun kemangi digunakan luas di Indonesia sebagai sumber pangan baik untuk penyedap makanan atau makanan pendamping (Mahajan *et al.*, 2014).

Penelitian sebelumnya telah banyak membuktikan bahwa ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) memiliki banyak manfaat. Beberapa penelitian diantaranya adalah ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) berfungsi sebagai hepatoprotektor mencit yang diinduksi isoniazid (Safitri, 2016), potensi antioksidan daun kemangi (*Ocimum sanctum*) pada kerusakan jaringan saraf (Munday *et al.*, 2013), efek antipiretik dan antiinflamasi *Ocimum sanctum* pada hewan uji artritis (Kacker *et al.*, 2013) dan ekstrak *aqueous Ocimum sanctum* yang berfungsi menurunkan serum glukosa, total kolesterol, trigliserida, creatinin, SGOT, SGPT, ALP dan kadar bilirubin pada tikus diabetik (Jayant dan Srivastava,

2016). Keempat penelitian ini menunjukkan manfaat dari ekstrak daun kemangi berasal dari kandungan flavonoid, fenolik, dan eugenol sebagai antioksidan.

Ekstrak daun kemangi telah terbukti banyak manfaat, pada takaran atau dosis tertentu suatu senyawa tetap memiliki probabilitas toksisitas dalam tubuh. Untuk mengetahui berapa takaran senyawa yang dapat menyebabkan efek toksik maka dilakukan uji toksisitas dengan mendata derajat bahaya sediaan uji bila terjadi pemaparan pada manusia (BPOM RI, 2014). Uji toksisitas akut merupakan salah satu evaluasi toksikologi dari ekstrak obat herbal yang dilakukan sebelum uji klinis (Sharwan *et al.*, 2015). Nilai potensi toksisitas akut atau *lethal dose 50* (LD₅₀) merupakan parameter yang digunakan pada uji toksisitas akut oral. Uji toksisitas dapat dilihat pada organ vital seperti ginjal yang merupakan tempat ekskresi senyawa asing seperti obat atau senyawa toksin yang masuk dalam tubuh. Ginjal merupakan organ yang rentan terhadap senyawa yang melewatinya. Hal ini dikarenakan nefron berfungsi mengonsentrasikan bahan toksik sehingga terjadi peningkatan kadar paparan bahan toksik di dalam tubulus (Hodgson, 2004). Senyawa pada ekstrak daun kemangi yang belum sepenuhnya diketahui bentuk dan sifatnya, dapat memengaruhi struktur histologi dan fungsi ginjal sebagai organ filtrasi dan ekskresi yang mengalami kontak dengan senyawa-senyawa tersebut (Adinata *et al.*, 2012).

Sejauh ini belum terdapat uji toksisitas akut oral pada ekstrak etanol 70% daun kemangi (*Ocimum sanctum*) pada mencit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas akut ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) Berdasarkan kisaran nilai LD₅₀ dan gambaran histopatologi ginjal mencit. Dengan dilakukannya uji toksisitas diharapkan dapat diketahui keamanan dari suatu senyawa dan dapat diteruskan untuk uji klinis sehingga ekstrak daun kemangi dapat dijadikan obat yang digunakan masyarakat secara luas.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat dirumuskan rumusan masalah penelitian sebagai berikut.

1. Berapakah kisaran nilai potensi toksisitas akut oral (LD_{50}) ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*)?
2. Bagaimana pengaruh pajanan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap histopatologi ginjal mencit?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui.

1. Kisaran nilai potensi toksisitas akut oral (LD_{50}) ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*)
2. Pengaruh gambaran histopatologi ginjal akibat pajanan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*)

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang dilakukan dari penelitian ini antara lain sebagai berikut.

1. Memberikan informasi keamanan dan potensi toksik dari ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*)
2. Merupakan data awal untuk penelitian selanjutnya yakni uji klinis sehingga ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dapat dijadikan suatu obat.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Kemangi

2.1.1 Definisi Kemangi

Kemangi (*Ocimum sanctum*) merupakan habitus berupa semak dengan tinggi 30-150 cm dan berbau wangi. Kemangi mempunyai batang kayu berbentuk segiempat, beralur, bercabang, mempunyai bulu, berwarna hijau. Daun kemangi termasuk jenis daun tunggal, berbentuk bulat seperti telur dengan ujung runcing, berpangkal tumpul, tepi yang mempunyai gerigi, berkerangka daun menyirip. Ukuran daun kemangi mempunyai panjang 14-16 mm, lebar 3-6 mm dengan tangkai panjang ± 1 cm dan berwarna hijau. Kemangi juga mempunyai bunga majemuk dengan bentuk tandan, berbulu, mempunyai daun pelindung berbentuk elips, bermahkota bulat telur dan berwarna putih (BPOM RI, 2008).

Kemangi memiliki buah berbentuk kotak dan berwarna coklat tua. Setiap buah memiliki 4 (empat) biji kemangi dengan ukuran kecil dan berwarna hitam. Untuk akarnya kemangi mempunyai akar tunggang berwarna putih dan kotor (BPOM RI, 2008).

2.1.2 Taksonomi Kemangi



Gambar 2.1. daun kemangi (*Ocimum sanctum*) (sumber: Badan POM RI, 2008)

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub Divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Ordo : Lamiales
Famili : Lamiaceae (Labiatae)
Genus : *Ocimum*
Spesies : *Ocimum sanctum*

2.1.3 Manfaat Kemangi

a. Antianafilaksis

Ekstrak *Ocimum sanctum* diketahui mempunyai potensi dalam menstabilkan sel mast, menyupresi IgE, dan menghambat pelepasan mediator inflamasi pada saat reaksi alergi seperti anafilaksis dan asma (Rahman *et al.*, 2011).

b. Efek penyembuhan luka

Ocimum sanctum meningkatkan produksi TNF- α yang menyebabkan penyembuhan luka lebih cepat. TNF- α ditemukan saat proses penyembuhan luka dan membuat peningkatan kecepatan epitelisasi (Rahman *et al.*, 2011).

c. Aktivitas antikanker

Ekstrak etanol daun *Ocimum sanctum* ditemukan dapat memodulasi enzim metabolisme karsinogen seperti sitokrom P-450, sitokrom B5, dan *aryl hydrocarbon hidroxilase* sehingga pada beberapa penelitian menunjukkan penurunan insidensi tumor (Rahman *et al.*, 2011).

d. Antiinflamasi

Beberapa ekstrak *Ocimum sanctum* baik metanol maupun *aqueous* menunjukkan efek analgesik, antipiretik, dan antiinflamasi karena aktivitas melawan PGE2, leukotrien, dan asam arakhidonat pada penelitian yang telah dilakukan (Pandhey dan Madhuri, 2010).

e. Antiartritis

Pada penelitian yang dilakukan pada tikus artritis menunjukkan perbaikan kondisi artritis. Hal ini dikarenakan ekstrak *Ocimum sanctum* menghambat mediator inflamasi seperti serotonin, histamin, bradikinin, dan PGE2 (Pandhey dan Madhuri, 2010).

f. Efek kardioprotektif

Ocimum sanctum ditemukan dapat menambah antioksidan endogen dan menghambat isopreterenol dalam menginduksi nekrosis miokardium. Selain itu ekstrak etanol *Ocimum sanctum* dapat memperbaiki neuropati perifer di tikus karena mengurangi kadar asam thiobarbiturat yang merupakan senyawa reaktif (Rahman *et al.*, 2011).

g. Efek pada sistem saraf pusat

Ekstrak etanol batang dan daun *Ocimum sanctum* efektif untuk mencegah konvulsi tonik. Selain itu *Ocimum sanctum* juga memiliki efek yang signifikan terhadap antistress dan efek anxiolitik. Hal ini dikarenakan *Ocimum sanctum* terlibat dalam sistem GABA-ergic dan mekanisme serotonergik (Rahman *et al.*, 2011).

h. Antiulserasi

Pada penelitian menunjukkan *Ocimum sanctum fixed oil* secara signifikan dapat memiliki efek antiulserasi dikarenakan menghambat lipooksigenase, antagonis histamin, dan efek antisekresi (Pandhey dan Madhuri, 2010).

i. Antidiabetik

Ekstrak *Ocimum sanctum* dapat menurunkan kadar gula darah pada kondisi diabet. Hal ini dikarenakan *Ocimum sanctum* mempunyai aktivitas aldolase reduktase sehingga dapat membantu menurunkan komplikasi diabetes seperti katarak dan retinopati (Pandhey dan Madhuri, 2010).

j. Antioksidan

Ekstrak *ocimum sanctum* pada penelitian yang telah dilakukan terbukti menurunkan kadar *malondialdehyde* dan meningkatkan kadar superoksida dismutase yang menandakan aktivitas antioksidan. Selain itu ekstrak ini juga

menurunkan peroksidasi lemak sehingga kadar oksigen reaktif dalam tubuh berkurang (Rahman *et al.*, 2011).

2.1.4 Kandungan dan Efek Farmakologi Kemangi

Kemangi mempunyai kandungan nutrisi seperti vitamin C, vitamin A, kalsium, zinc, besi, klorofil dan fitonutrien lain. Dalam 100 g kemangi didapatkan protein 4,2 gram, lemak 0,5 gram, karbohidrat 2,3 gram, kalsium 25 mg, fosfor 287 mg, besi 15,1 mg, dan vitamin C sebanyak 25 mg (Pattanayak *et al.*, 2010).

Kandungan fitokimia yang terdapat pada daunnya adalah flavonoid, alkaloid, dan saponin (Siva *et al.*, 2016). Pada analisis fitokimia ekstrak etanolnya didapatkan beberapa senyawa seperti alkaloid, tannin, dan flavonoid. Antioksidan alami didapatkan terutama dari senyawa fenol diantaranya flavonoid, asam fenol, tokoferol, dan lain-lain. Senyawa fenol merupakan senyawa metabolit sekunder dari kemangi yang telah diketahui mempunyai kemampuan sebagai *free radical scavenging*. Aktivitas antioksidan dari fenol secara prinsip didapatkan dari sifat redoksnya yang berfungsi sebagai penurunan oksidan bebas dan sebagai donor hidrogen (Rana *et al.*, 2015).

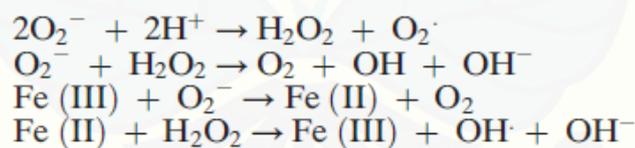
Selain fenol, alkaloid juga merupakan senyawa metabolit sekunder diketahui sebagai antioksidan alami. Beberapa alkaloid mempunyai peran utama sebagai antioksidan dengan membantu detoksifikasi dari ROS akibat stres (Matsuura *et al.*, 2014). Mitokondria merupakan target aktivitas antioksidan alkaloid ini. Sebagaimana mitokondria merupakan sumber utama intraseluler dari reaktif oksigen spesies (ROS) (Apostolova dan Victor, 2015).

2.2 Antioksidan dan Prooksidan

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron yang memiliki berat molekul kecil namun mampu menginaktivasi dan menghambat reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi yang inaktif tidak akan membentuk radikal bebas yang sangat reaktif. Bila senyawa reaktif lebih banyak daripada antioksidan maka dapat menyebabkan berikatan dengan komponen lipid, protein maupun DNA. Hal ini mengakibatkan kerusakan pada komponen tersebut yang disebut dengan stress

oksidatif. Antioksidan dapat berupa enzim dan non-enzimatis. Antioksidan berupa enzim misalnya superoksida dismutase, katalase, glutathion peroksidase, vitamin E, C, flavonoid dan lain-lain. Antioksidan ini merupakan pertahanan utama terhadap stres oksidatif. Sedangkan antioksidan non enzimatis berfungsi sebagai penangkap senyawa oksidan serta pencegah reaksi berantai (Winarsih, 2007). Contoh senyawa antioksidan non enzimatis adalah kofaktor enzim (Q10), senyawa nitrogen (asam urat), asam fenol dan peptida (glutathion) (Carocho dan Ferreira, 2013).

Antioksidan mempunyai sifat prooksidan pada saat tertentu. Antioksidan dapat berbalik fungsi dengan mendukung stress oksidatif (Carocho dan Ferreira, 2013). Prooksidan terbentuk pada saat konsentrasi tertentu, pemberian dosis tinggi atau adanya ion logam (Yordi *et al.*, 2012). Ion logam yang dapat merubah antioksidan menjadi prooksidan terutama Fe [Fe (III)] dan Cu [Cu (II)]. Padahal di tubuh manusia zat besi berperan penting dalam fisiologi tubuh. Besi digunakan sebagai banyak protein untuk transpor oksigen, transpor elektron, dan katalis pada reaksi redoks. Besi juga merupakan bagian dari hemoglobin, sitokrom C, dan sitokrom P450. Besi dapat bereaksi dengan hidrogen peroksida untuk memproduksi radikal hidroksil yang disebut dengan reaksi fenton seperti pada Gambar 2.2 (Eghbaliferiz, 2016).



Gambar 2.2. Reaksi Fenton (sumber: Eghbaliferiz, 2016)

Fe (III) dapat bereaksi dengan O_2^- lalu memproduksi Fe (II) dan oksigen molekuler. Hidrogen peroksida dapat menjadi prekursor terbentuknya radikal hidroksil (OH) yang merupakan oksidan yang kuat. Oksidan yang kuat ini dapat memicu inaktivasi enzim, degradasi protein, kerusakan DNA, peroksidasi lipid, dan kematian sel.

2.3 Tinjauan Toksikologi

Toksikologi adalah salah satu cabang ilmu yang mempelajari tentang toksin dan racun serta efek dan tatalaksananya. Hal ini yang mendasari pentingnya

pemeriksaan toksikologi untuk mengembangkan obat baru dan potensi terapi dari senyawa yang telah diketahui sebelumnya. Penelitian toksikologi dengan menggunakan hewan dimulai pada tahun 1920 untuk mengetahui 50% *lethal dose* (LD₅₀). Dengan LD₅₀ dapat diketahui dosis pada suatu zat untuk dapat memberikan kematian pada 50% subjek yang mengonsumsi zat tersebut. Hal ini menunjukkan semakin besar LD₅₀ maka semakin baik senyawa yang diuji. Selain menggunakan LD₅₀, toksisitas suatu zat dapat juga dinilai dengan uji mata dan kulit pada hewan uji. Pada tahun 1980 *Organisation For Economic Co-Operation and Development* (OECD) mempunyai pedoman untuk uji toksisitas dari senyawa obat atau yang berkenaan dengan farmasi (Parasuraman, 2011).

Pedoman dari OECD merupakan alat untuk menilai efek potensial dari zat kimia pada kesehatan manusia dan kesehatan lingkungan. Pedoman OECD ini disetujui sebagai standar internasional untuk uji keamanan. Terdapat 150 metode yang disetujui secara internasional untuk mengidentifikasi dan mencari potensi bahaya dari suatu senyawa dengan berdasarkan waktu paparan dan target organ yang mengalami toksisitas (OECD, 2017).

Tidak jauh berbeda dengan OECD, menurut BPOM RI (2014:1), paparan suatu zat pada manusia dapat diketahui dengan mengetahui efek kumulatif dan dosis yang dapat menimbulkan efek toksik pada manusia. Hal tersebut dapat diperoleh dari percobaan menggunakan hewan uji untuk uji toksisitas. Uji toksisitas mempunyai berbagai cara uji berdasarkan kemungkinan terjadinya risiko pada manusia. Uji toksisitas tersebut diklasifikasikan menurut waktu meliputi uji toksisitas akut oral, toksisitas subkronis oral, toksisitas kronis oral, iritasi akut dermal, toksisitas akut dermal, dan toksisitas subkronis dermal. Selain itu, uji toksisitas dapat diklasifikasikan berdasarkan organ target meliputi teratogenitas, sensitisasi kulit, dan iritasi mata.

2.4 Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut merupakan uji untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat (tidak lebih dari 24 jam) setelah pemberian senyawa dalam dosis tunggal atau dosis berulang dengan menggunakan hewan uji. Penilaian

toksistas akut didapatkan dari kematian hewan uji serta gambaran histopatologi organ yang terkena toksistas. Uji toksistas akut dilakukan pada dua jenis hewan yaitu rodensia dan nonrodensia. Senyawa yang diujikan diberikan dalam beberapa dosis bertingkat kemudian dilakukan pengamatan selama 14 hari (Sasmito *et al.*, 2015). Dengan uji toksistas akut ini dapat diidentifikasi senyawa yang toksik dan diperoleh informasi bahaya terhadap manusia bila terpajan. Selain itu dengan uji toksistas akut ini akan didapatkan nilai LD₅₀ dari suatu senyawa (BPOM RI, 2014).

Penentuan LD₅₀ telah digunakan sebagai parameter untuk mengukur toksistas akut serta prosedur awal dari skrining suatu senyawa dan agen farmakologi. LD₅₀ merupakan dosis yang menyebabkan kematian pada 50% hewan uji. Selain dari kematian, terdapat beberapa hal yang dapat diobservasi pada saat uji toksistas akut yaitu onset, durasi dan derajat pemulihan pada hewan yang bertahan juga penting untuk mengevaluasi toksistas. Sehingga uji toksistas akut memberikan informasi tentang LD₅₀, indeks terapi dan derajat keamanan suatu senyawa. Hal tersebut merupakan prosedur penting sebelum suatu senyawa dapat memasuki pasar dan digunakan secara massal (Chinedu *et al.*, 2013).

Menentukan nilai LD₅₀ cara konvensional membutuhkan hewan uji yang banyak serta memiliki angka mortalitas tinggi, sehingga metode baru dimunculkan untuk mengurangi hewan uji. Menurut OECD (2001) terdapat 3 metode yaitu OECD 420 – *fix dose procedure* (FDP), OECD 423 – *acute toxic class method* (ATC), dan OECD 425 – *up and down method* (UDP). Metode FDP dilakukan dengan cara mengatur kadar dosis tetap yaitu 5, 50, 500 dan 2000 mg/KgBB pada waktu tertentu. Metode ATC merupakan rangkaian prosedur dimana 3 hewan setiap prosedur dengan skrining 4 dosis permulaan dan uji dilakukan dengan dasar penggolongan *Globally Harmonized Classification* (GHS) seperti pada Tabel 2.1 (Parasuraman, 2011).

Tabel 2.1 Penggolongan sediaan uji menurut GHS

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

(Sumber: BPOM RI, 2014)

Metode UDP menggunakan rangkaian dosis tunggal dengan interval 48 jam. Jika hewan uji pertama bertahan maka dilanjutkan dengan dosis yang lebih tinggi yaitu faktor 3,2 dari dosis awal (OECD, 2001).

2.5 Uji Toksisitas Akut Oral Metode 420

OECD Pada tahun 2001 mempublikasikan metode standar OECD 420 – *fix dose procedure*. Pada metode OECD 420 hewan uji yang digunakan lebih sedikit daripada metode konvensional, OECD 423 ATC yang menggunakan 3 hewan uji tiap tahapan dan rata-rata hewan yang dikorbankan adalah 7 ekor, dan OECD 425 UDP yang rata-rata menggunakan 6-9 ekor (OECD, 2001).

OECD 420 memiliki 3 jenis perlakuan yaitu uji pendahuluan, *limit test* (uji pembatasan), dan *main test* (uji utama). Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan dosis awal yang akan diberikan kepada hewan uji. Uji pendahuluan dihentikan apabila terbukti adanya kematian hewan uji atau bukti toksisitas berupa perubahan aktivitas otonom hewan uji seperti berjalan menggunakan perut, diare, *discharge* dari hidung, menyiksa diri sendiri atau perdarahan di orifisium. *Main test* atau uji utama digunakan untuk uji yang sebenarnya untuk mengetahui kisaran nilai LD₅₀ suatu senyawa

Limit test atau uji pembatasan digunakan dalam situasi di mana peneliti memiliki informasi yang menunjukkan bahwa bahan uji cenderung tidak toksik atau memiliki toksisitas hanya melebihi batas dosis yang telah ditentukan. Uji dengan dosis melebihi 2000 mg/KgBB dilakukan prosedur uji pendahuluan dan uji utama. Uji pendahuluan dilakukan dengan menambah satu tingkat dosis diatas 2000 mg/KgBB yakni dosis 5000 mg/KgBB. Jika hewan uji mati maka dosis diturunkan menjadi 2000 mg/KgBB. Apabila tidak terdapat kematian atau bukti toksisitas maka uji utama diperbolehkan menggunakan dosis 5000 mg/KgBB (OECD, 2001). Uji utama dalam uji pembatasan ini dimulai dosis 5000 mg/KgBB dan jika hasilnya adalah ≥ 2 kematian maka dilakukan uji yang diturunkan pada dosis 2000 mg/KgBB. Apabila hasil dari uji utama terdapat bukti toksisitas dan/atau ≤ 1 kematian atau tidak ada bukti toksisitas maka pada senyawa tersebut tidak dapat dimasukkan ke dalam klasifikasi GHS atau yang disebut dengan *unclassified* (OECD, 2001).

Sekelompok hewan uji dengan jenis kelamin yang sama diberikan dosis bertingkat menggunakan metode *fix doses* antara lain: 5, 50, 300 dan 2000 mg/KgBB. Dosis awal dipilih berdasarkan uji pendahuluan sebagai dosis yang dapat menimbulkan gejala toksisitas ringan tetapi tidak menimbulkan efek toksik yang berat atau kematian. Prosedur ini 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 (BPOM RI, 2014).

2.6 Ginjal

2.6.1 Anatomi Ginjal

Ginjal merupakan sepasang organ saluran kemih yang terletak di rongga retroperitoneal bagian atas dengan bentuk menyerupai kacang. Besar dan berat ginjal bervariasi tergantung pada jenis kelamin, umur, dan ada tidaknya ginjal pada sisi yang lain. Berat ginjal kanan pada mencit betina memiliki berat 0,519% dari berat badan sedangkan berat ginjal kiri pada mencit betina memiliki berat 0,493% dari berat badan (Gupta, 2017). Ginjal mempunyai peran yang penting bagi

kehidupan, yakni menyaring sisa hasil metabolisme dan toksin dari darah serta mempertahankan homeostatis cairan dan elektrolit tubuh (Purnomo, 2011).

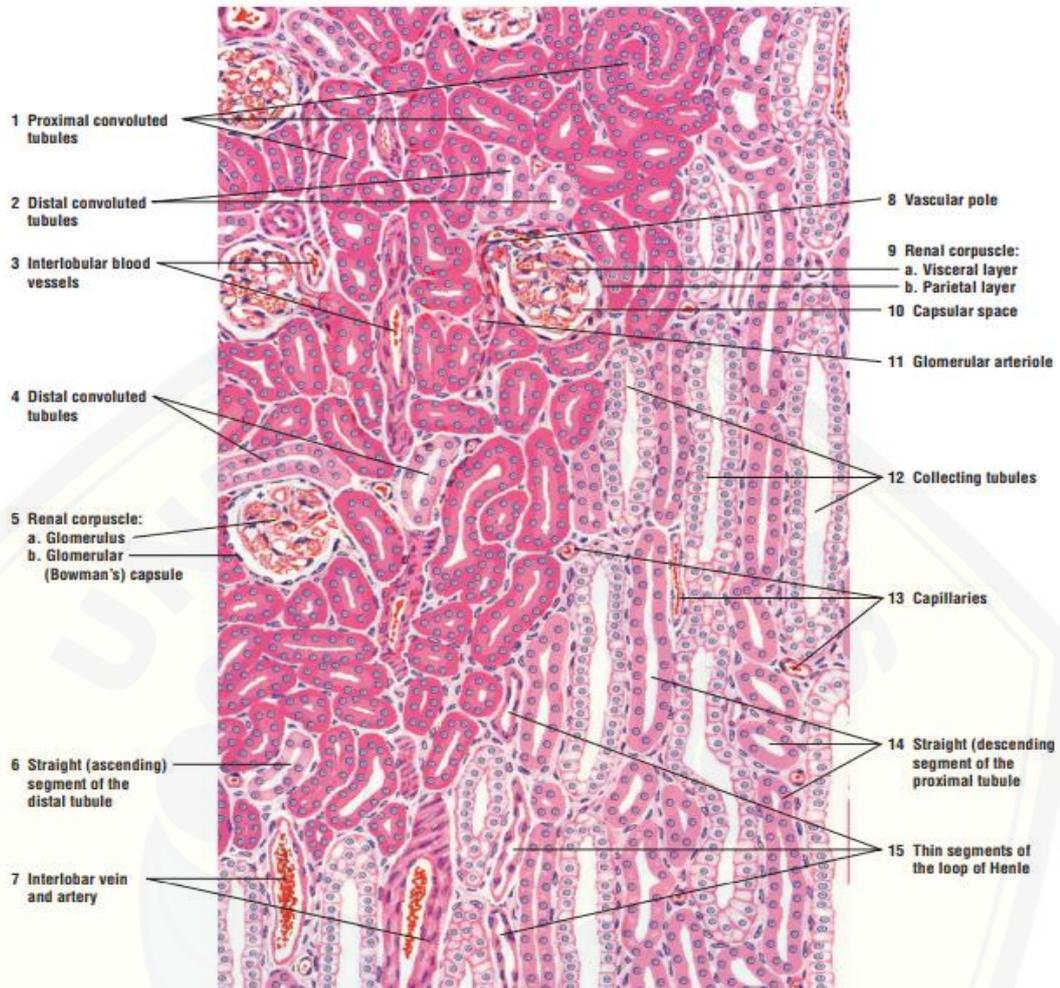
Setiap ginjal pada bagian superior terdapat kelenjar adrenal yang terbenam di dalam lemak dan jaringan ikat ginjal. Batas medial ginjal memiliki cekungan yang disebut dengan hilum. Hilum merupakan tempat keluarnya arteri renalis, vena renalis, dan pelvis renalis (Eroschenko, 2008).

Ginjal secara anatomis dibagi menjadi korteks dan medula ginjal. Korteks terletak lebih superfisial dan di dalamnya terdapat berjuta-juta nefron. Nefron terdiri dari glomerulus, tubulus kontortus proksimal, lengkung henle, tubulus kontortus distal, dan duktus koligentes. Sedangkan medula ginjal terletak lebih profundus yang terdiri dari saluran kecil yang mengalirkan hasil ultrafiltrasi berupa urin (Purnomo, 2011).

2.6.2 Histologi Ginjal

Ginjal dibagi menjadi korteks yang terpulas gelap dan medula yang terpulas terang pada pewarnaan hematoxilin dan eosin. Korteks memiliki beberapa struktur yaitu korpuskulum ginjal yang terdiri dari glomerulus, kapsul bowman, tubulus kontortus proksimal, lengkung henle, dan tubulus kontortus distal. Glomerulus adalah sekumpulan kapiler yang dibentuk dari arteriol glomerulus aferen. Tubulus kontortus merupakan segmen awal dan akhir pada nefron. Tubulus kontortus proksimal memiliki lumen kecil tidak rata dan satu lapis sel kuboid eosinofilik bermikrovili. Sedangkan tubulus kontortus distal memiliki lumen yang lebih besar dengan sel kuboid yang lebih kecil dan tidak terdapat mikrovili (Eroschenko, 2008).

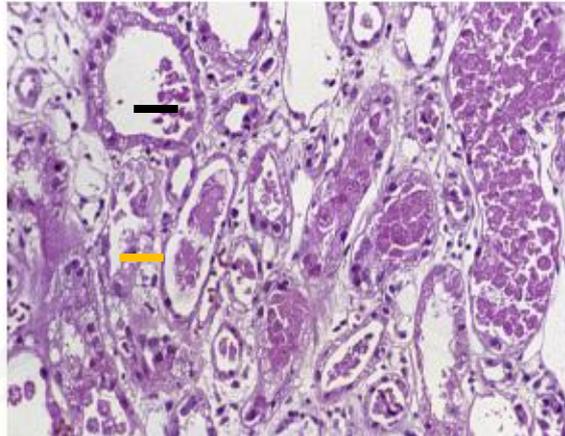
Medula ginjal mengandung bagian lurus tubulus dan segmen lengkung henle. Lengkung henle terdiri dari beberapa bagian yaitu desenden tebal, asenden, dan desenden tipis. Segmen desenden tebal mirip dengan tubulus kontortus proksimal, segmen asenden mirip dengan tubulus kontortus distal, dan segmen tipis dilapisi oleh epitel selapis pipih (Eroschenko, 2008).



Gambar 2.3 Korteks dan medula ginjal pembesaran lemah (sumber: Eroschenko, 2008)

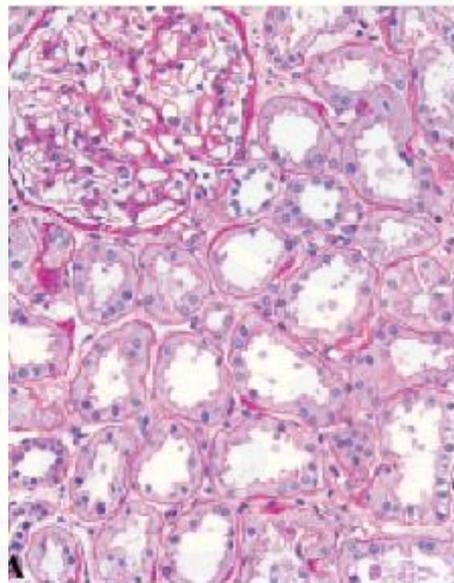
2.6.3 Histopatologi Ginjal

Histopatologi ginjal merupakan gambaran patologis dari ginjal salah satunya berupa nekrosis tubular akut (NTA). Nekrosis tubular akut disebabkan oleh iskemik atau pengaruh toksin (Rosen dan Stillman, 2008). Pada temuan mikroskopis di mikroskop cahaya akan terdapat gambaran nekrosis nyata dan peluruhan sel. Apabila penyebab utama NTA adalah toksin maka tubulus proksimal yang paling umum dan paling parah kerusakannya. Lumen tubulus akan terisi sel yang nekrosis dan intersisial akan edema. Ciri diagnostik pada NTA secara mikroskopis seperti pada Gambar 2.3 yaitu sel epitel tubular yang terlepas tersebar di lumen, tubulus kehilangan brush border yang jelas pada pemulasan *acid-schiff* dan epitel tubular menjadi rata (Fogo *et al.*, 2016).



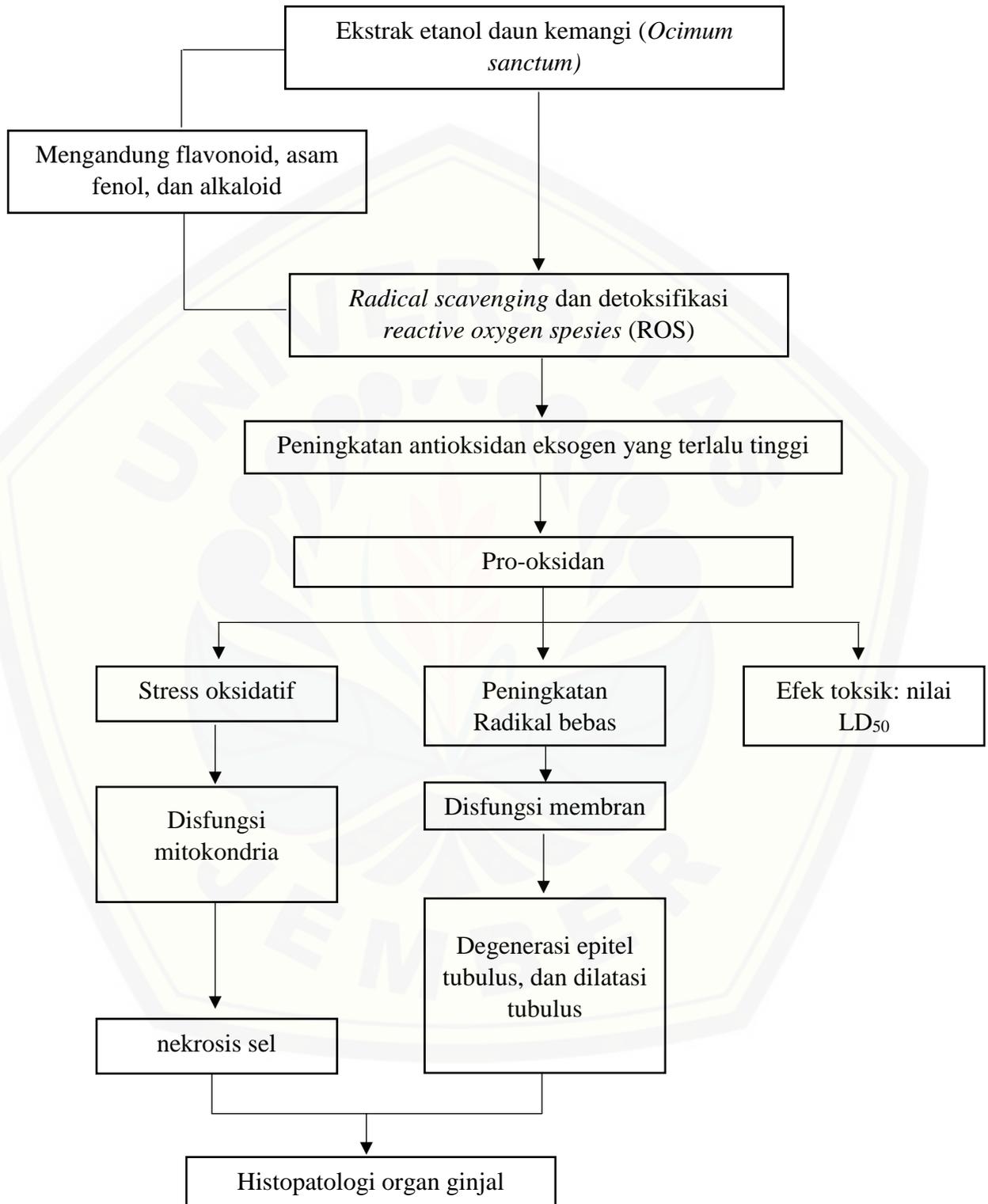
Gambar 2.4 Nekrosis tubular akut dengan sel epitel tubular yang terlepas tersebar di lumen (garis hitam), dan epitel tubular menjadi rata (garis kuning) pada pewarnaan hematoksilin dan eosin (Fogo *et al.*, 2016).

Tidak jauh berbeda dengan Gambar 2.4, Gambar 2.5 merupakan gambaran histopatologi dari NTA dengan menunjukkan dilatasi dari lumen tubulus dan sedikit kerusakan pada brush border namun tidak ditemukan adanya nekrosis sel (Rosen dan Stillman, 2008).



Gambar 2.5 Nekrosis tubular akut dengan dilatasi lumen tubulus pada pembesaran 200 kali (Rosen dan Stillman, 2008).

2.7 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 2.6 Kerangka konseptual penelitian

—————> : memicu

Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) memiliki kandungan fitokimia yakni flavonoid, asam fenol, dan alkaloid. Kandungan tersebut berperan sebagai *radical scavenger* dan mempunyai fungsi untuk mendetoksifikasikan ROS yang kemudian meningkatkan kadar antioksidan eksogen dalam tubuh. Pada saat tertentu antioksidan dapat berbalik fungsi dengan mendukung stress oksidatif menjadi prooksidan (Carocho dan Ferreira, 2013). Prooksidan terbentuk pada saat konsentrasi tertentu, pemberian dosis tinggi atau adanya ion logam (Yordi *et al.*, 2012). Prooksidan inilah yang memicu adanya peningkatan stres oksidatif dan radikal bebas. Stres oksidatif menyebabkan disfungsi mitokondria sehingga terjadi nekrosis sel (Small *et al.*, 2012). Sedangkan peningkatan radikal bebas menyebabkan disfungsi membran yang akhirnya akan menyebabkan degenerasi epitel tubulus dan dilatasi tubulus (Putri dan Thaha, 2014). Ginjal merupakan tempat ekskresi suatu senyawa yang masuk dalam tubuh. Pada ginjal memerlukan banyak energi dari metabolisme aerobik oleh mitokondria. Kerusakan mitokondria akan menyebabkan penurunan fungsi anatomis maupun fisiologis sehingga mitokondria merupakan organel sel yang vital dalam sel ginjal. Kerusakan pada ginjal dapat dilihat dengan gambaran histopatologi ginjal sedangkan toksisitas dari ekstrak daun kemangi dapat dilihat dengan parameter kisaran nilai LD₅₀.

2.8 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) mempunyai kisaran LD₅₀ yang tinggi.
2. Gambaran histopatologi ginjal mencit mengalami perubahan setelah pajanan ekstrak etanol daun kemangi pada dosis tinggi.

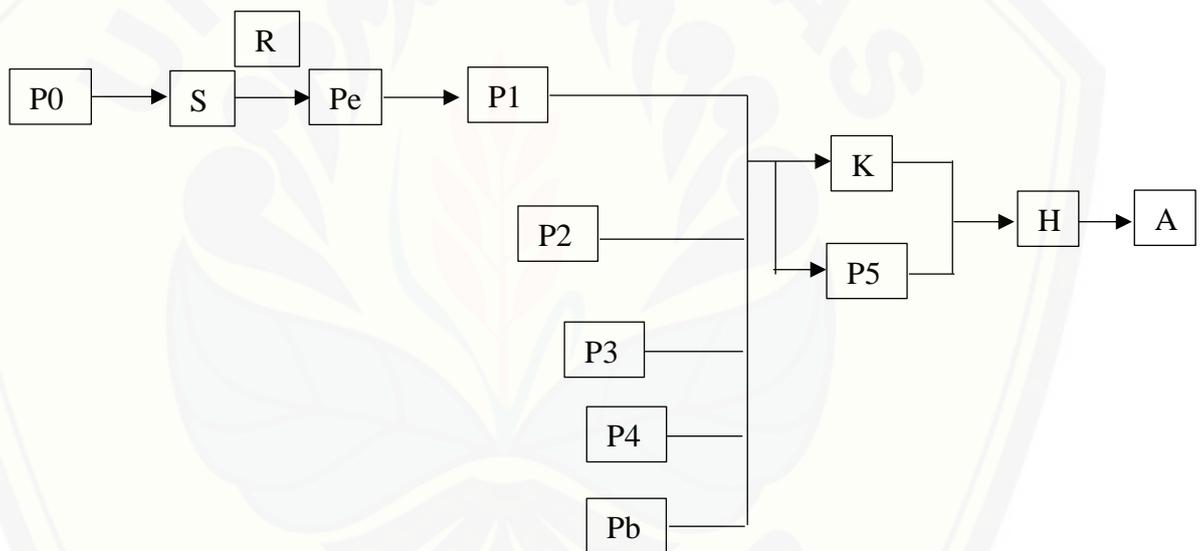
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *experimental* dengan rancangan penelitian *two group post test only control group design*.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah *post test only control group design*. Dengan sebelumnya dilakukan uji pendahuluan untuk menentukan dosis awal uji utama.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan

- P0 : populasi mencit
- S : Sampel
- R : Hewan uji dipilih secara acak dan ditandai untuk identifikasi individu
- Pe : uji pendahuluan
- P1 : uji utama kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol daun kemangi dosis sesuai dengan hasil uji pendahuluan selama 14 hari
- P2 : apabila P1 tidak terdapat kematian maka diberikan dosis satu tingkat diatas dosis awal. Apabila didapatkan ≥ 2 hewan uji mati maka dosis diturunkan satu tingkat dibawah dosis awal. Apabila terdapat ≥ 1 bukti toksisitas dan/atau ≤ 1 kematian hewan uji maka dapat langsung ditentukan kisaran nilai LD₅₀ lalu dilakukan tahap skema selanjutnya

- P3 : apabila P2 tidak terdapat kematian maka diberikan dosis satu tingkat diatas dosis awal. Apabila didapatkan ≥ 2 hewan uji mati maka dosis diturunkan satu tingkat dibawah dosis awal. Apabila terdapat ≥ 1 bukti toksisitas dan/atau ≤ 1 kematian hewan uji maka dapat langsung ditentukan kisaran nilai LD₅₀ lalu dilakukan tahap skema selanjutnya
- P4 : apabila P3 tidak terdapat kematian maka diberikan dosis satu tingkat diatas dosis awal. Apabila didapatkan ≥ 2 hewan uji mati maka dosis diturunkan satu tingkat dibawah dosis awal. Apabila terdapat ≥ 1 bukti toksisitas dan/atau ≤ 1 kematian hewan uji maka dapat langsung ditentukan kisaran nilai LD₅₀ lalu dilakukan tahap skema selanjutnya
- Pb : uji pembatasan
- P5 : kelompok perlakuan yang diberikan dosis LD₅₀ pada perlakuan sebelumnya.
- H : histopatologi organ ginjal setelah pemberian ekstrak etanol daun kemangi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang terbukti terdapat toksisitas dengan seluruh hewan uji dikorbankan dan diambil organ ginjal untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi
- A : analisis data

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di empat tempat, yaitu Laboratorium Farmakologi dan Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk pemeliharaan hewan uji, Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak etanol daun kemangi, Laboratorium Patologi Anatomi RSD dr. Soebandi untuk pembuatan preparat histopatologi ginjal hewan uji, dan Laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembacaan histopatologi ginjal. Waktu pelaksanaan adalah bulan Oktober-November 2017.

3.4 Variabel Penelitian

Jenis variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis bertingkat ekstrak etanol daun kemangi dalam mg/KgBB.
- b. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah kematian hewan uji dan gambaran histopatologi ginjal hewan uji.
- c. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:
 - 1) frekuensi pemberian ekstrak daun kemangi dalam 24 jam diberikan 1 kali pemberian dosis tunggal
 - 2) cara pemberian sediaan secara oral dengan menggunakan jarum sonde mencit

- 3) jenis hewan uji yang digunakan pada penelitian adalah hewan uji mencit strain Balb/c betina
- 4) berat badan hewan uji 16-26 gram
- 5) umur hewan uji 8-12 minggu
- 6) aklimitasi hewan uji sebelum pengujian ekstrak selama 5 hari.

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Ekstrak Etanol Daun Kemangi

Ekstrak etanol daun kemangi merupakan hasil ekstraksi daun kemangi dengan pelarut etanol 70%. Daun kemangi didapatkan di Dusun Ragang Timur, Desa Sukowono, Kecamatan Sukowono, Jember yang telah dipastikan tidak diberikan pestisida selama penanaman dan dideterminasi di Fakultas Pertanian Universitas Jember. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran B. Metode yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak etanol daun kemangi adalah metode maserasi. Ekstrak etanol akan dilarutkan ke tween 80 dengan dosis secara oral dengan volume 0,5 mL/KgBB/hari (Utomo *et al*, 2017). Ekstrak etanol diberikan dalam volume 1 ml/100gram hewan uji (BPOM RI, 2014).

3.5.2 Dosis Bertingkat

Dosis ditentukan sesuai dengan metode OECD 420 FDP yaitu 5, 50, 300 dan 2000 mg/KgBB. Dosis tersebut dapat dinaikkan atau diturunkan berdasarkan skema uji toksisitas akut pada Gambar 3.2.

3.5.3 Jumlah Kematian Hewan Uji

Jumlah kematian hewan uji yang ditimbulkan oleh pajanan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dalam kurun waktu 14 hari pengamatan. Jumlah kematian hewan uji inilah yang menentukan nilai LD₅₀ ekstrak etanol daun kemangi.

3.5.4 Pengamatan Histopatologi Ginjal

Histopatologi ginjal merupakan struktur ginjal yang mengalami keadaan patologis berupa nekrosis tubular akut dengan proses kerusakan jaringan ginjal. Gambaran patologisnya berupa degenerasi epitel tubulus proksimal, nekrosis, dan dilatasi tubulus. Tahap nekrosis sel dimulai dari piknosis yang ditandai dengan penebalan inti kromatin menjadi karioksis dan kariolisis sehingga saat pewarnaan sel yang tidak menyerap warna akan terlihat pucat. Sel epitel yang meluruh akan menimbulkan dilatasi tubulus dengan pelebaran diameter tubulus 2-3 kali ukuran normal. Degenerasi tubulus ditandai dengan terjadinya vakuolisasi hingga sel tampak membengkak dengan sitoplasma pucat. Pengamatan dilakukan pada perbesaran 400 kali pada 5 lapang pandang yang didapatkan dari keempat ujung preparat dan tengah preparat untuk melihat dilatasi tubulus, nekrosis inti, dan degenerasi tubulus. Untuk mendapatkan data semi kuantitatif dilakukan skoring terhadap perubahan histopatologi ginjal hewan uji sebagai berikut.

Tabel 3.1 Skoring histopatologi (Suhita *et al.*, 2013)

Item	Skor
Tidak ditemukan nekrosis inti, degenerasi tubulus, dilatasi tubulus proksimal	0
Ditemukan lesi fokal seperti nekrosis inti, degenerasi tubulus, dilatasi tubulus proksimal	1
Ditemukan lesi difus/merata seperti nekrosis inti, degenerasi tubulus, dilatasi tubulus proksimal	2

3.6 Alat Dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

- a. Alat untuk pemeliharaan hewan uji adalah bak plastik, penutup kawat, tempat makan, botol minum dan label.
- b. Alat untuk pembuatan ekstrak daun kemangi adalah *blender*, ayakan, timbangan, oven, *erlenmeyer*, kertas saring, toples kaca, *rotatory evaporator* dan pengaduk.
- c. Alat untuk pemberian ekstrak daun kemangi adalah *beaker glass*, pengaduk, spuit sonde, dan handscoon.

- d. Alat untuk pengambilan ginjal hewan uji adalah, scalpel, pisau bedah, papan fiksasi dan handscoon
- e. Alat untuk pembuatan preparat histopatologi ginjal adalah kaca objek, *cover glass*, dan mikroskop cahaya.

3.6.2 Bahan Penelitian

- a. Bahan untuk pemeliharaan hewan uji adalah air, sekam, makanan pellet turbo 512.
- b. Bahan untuk ekstrak daun kemangi adalah daun kemangi dan etanol 70%
- c. Bahan untuk menyonde hewan uji adalah ekstrak etanol daun kemangi, dan tween 80
- d. Bahan untuk pembuatan preparat histopatologi adalah buffered neutral formalin 10%, eter, xylol I, xylol II, alkohol dengan kadar 50%, 70%, 80%, 90%, dan 100%, cairan perekat (DPX), hemaktosilin dan eosin.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Pemilihan Hewan Uji

Hewan yang digunakan adalah mencit Balb/c. Umumnya digunakan rodensia betina karena lebih sensitif dibandingkan rodensia jantan. Kriteria hewan uji meliputi:

- a. Hewan dewasa dan tidak ada kelainan anatomi.
- b. Hewan betina harus yang belum pernah beranak dan tidak sedang hamil.
- c. Pada permulaan uji, setiap hewan harus berumur 8-12 minggu dengan variasi berat badan 16-26 gram.

Hewan dipilih secara acak dan ditandai untuk mengidentifikasi setiap individu.

3.7.2 Adaptasi Hewan uji

Sebelum hewan uji diberikan perlakuan, hewan uji diadaptasikan selama 5 hari di Laboratorium Farmakologi dan Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk menyesuaikan dengan lingkungan baru. Makanan turbo 512 sediaan

pellet dan air diberikan secara *ad libitum* pada semua kandang. Adaptasi hewan uji dilakukan dengan meletakkan hewan uji pada ruangan dengan suhu 19⁰-25⁰ C. Pencahayaan di ruangan diatur 12 jam terang dan 12 jam gelap. Kandang hewan uji berisi 5 ekor sesuai dengan dosis yang diberikan perkelompok (OECD, 2001).

3.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum Sanctum*)

Daun kemangi sebanyak 4 kg dicuci bersih dengan air, kemudian dikeringkan. Daun yang telah dikeringkan dihaluskan menggunakan *blender* hingga menjadi serbuk. Serbuk diayak dengan menggunakan ayakan hingga didapatkan serbuk halus. Lalu, serbuk daun kemangi sebanyak 400 gram dimasukkan ke dalam toples, setelah itu ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 3 L dengan perbandingan 1:7,5. Cara maserasi dengan merendam bahan menggunakan etanol 70% dan diaduk secara terus menerus. Setelah itu didiamkan 72 jam. Kemudian dilakukan penampungan filtrat. Setelah filtrat didapatkan maka dilakukan evaporasi dengan menggunakan *rotatory evaporator* dengan suhu 50⁰ C hingga pelarut etanol 70% menguap dan didapatkan hasil ekstrak semi kental etanol daun kemangi (Ali *et al.*, 2017).

3.7.4 Pembuatan sediaan ekstrak daun kemangi

Sediaan ekstrak daun kemangi yang dibuat pada penelitian ini sesuai dengan *fix dose* yang telah ditentukan yaitu 5 mg/KgBB, 50 mg/KgBB, 300 mg/KgBB, dan 2000 mg/KgBB. Dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah dosis 300mg/KgBB dan 2000mg/KgBB. Dosis dikonversi menjadi dosis mencit Balb/c dengan berat rata-rata 20 gram. Tabel dosis pemberian ekstrak etanol daun kemangi dapat dilihat pada Lampiran C.

Pada dosis 2000mg/KgBB maka dosis pada hewan uji:

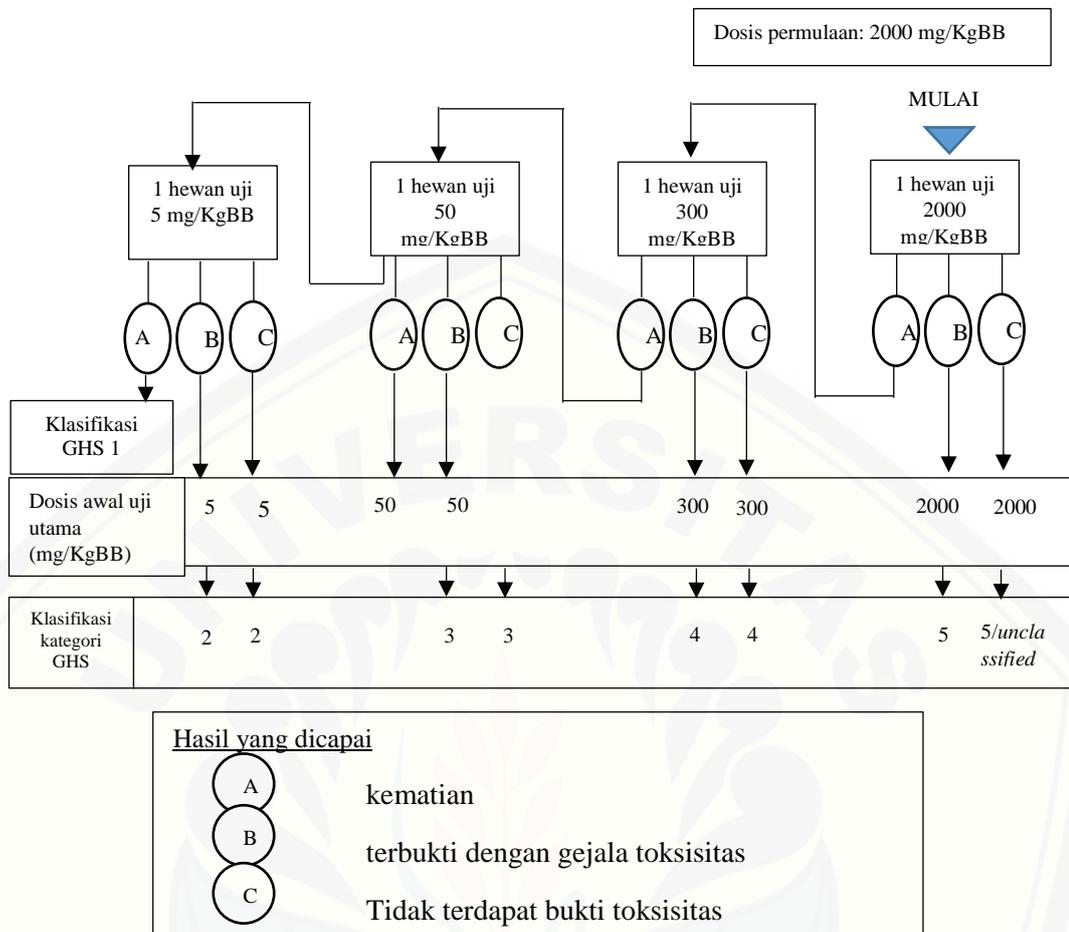
$$\frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{20 \text{ g}}$$
$$X = 40 \text{ mg}$$

Ekstrak etanol daun kemangi yang telah ditimbang sesuai dengan berat badan mencit dilarutkan kedalam tween 80 sebanyak 0,01 mL/20 gram mencit. Larutan ekstrak dan tween 80 diencerkan dengan aquades hingga volume 0,2 mL.

3.7.5 Uji Toksisitas Akut

a. Uji Pendahuluan Toksisitas Akut Dengan Metode OECD 420

Tujuan dari uji pendahuluan adalah mencari dosis awal yang sesuai untuk uji utama. Dosis awal pada uji pendahuluan dapat dipilih dari tingkatan *fix dose*: 5, 50, 300, dan 2000 mg/KgBB sebagai dosis yang diharapkan dapat menimbulkan efek toksik. Pemeriksaan menggunakan dosis 5000 mg/KgBB hanya dilakukan bila benar-benar diperlukan. Uji dilakukan sesuai dengan skema pada Gambar 3.2. Interval waktu pengamatan sekurang-kurangnya 24 jam pada setiap dosis dan hewan harus diamati sekurang-kurangnya selama 14 hari.



Gambar 3.2 Skema penentuan dosis uji pendahuluan OECD 420 (sumber: OECD, 2001)

Bila saat uji terdapat kematian pada dosis 2000 mg/KgBB maka dilakukan uji pendahuluan pada dosis 300 mg/KgBB dan seterusnya seperti pada Gambar 3.2. tidak terbukti adanya gejala toksisitas maka dosis uji utama adalah 2000 mg/KgBB. Bukti toksisitas yang dimaksud berupa perubahan aktivitas otonom hewan uji seperti berjalan menggunakan perut, diare, *discharge* dari hidung, menyiksa diri sendiri atau perdarahan di orifisium (OECD, 2001).

b. Uji Utama Toksisitas Akut Metode OECD 420

Langkah pertama dalam melakukan uji toksisitas akut metode 420 adalah adaptasi dan pengelompokan hewan uji yang telah diacak. Sebelum diberikan pemajanan ekstrak daun kemangi, hewan uji ditimbang terlebih dahulu dan dihitung volume pemberian untuk masing-masing hewan uji untuk dosis awal yang telah

ditentukan pada uji pendahuluan. Pada uji pendahuluan yang telah dilakukan didapatkan dosis awal 2000 mg/KgBB. Pengamatan dilakukan secara intensif 30 menit pertama setelah pemberian ekstrak, 4 jam pertama, dan sehari sekali selama 14 hari. Penelitian yang telah dilakukan tidak terdapat ≥ 1 bukti toksisitas dan/atau ≤ 1 kematian hewan uji maka tidak dapat langsung ditentukan kisaran nilai LD₅₀. Penelitian ini juga tidak terdapat ≥ 2 hewan uji dan tidak terbukti adanya bukti toksisitas maka termasuk kategori 5 GHS. Untuk skema uji utama uji toksisitas metode OECD 420 ini dapat dilihat pada Gambar 3.2 kemudian diklasifikasikan dalam kategori GHS pada Tabel 3.2.

Kelompok kontrol pada uji toksisitas adalah 5 ekor hewan uji yang diberikan tween 80 sesuai dengan berat badan hewan uji (0,01/20gram). Kelompok kontrol normal ini diuji untuk mengetahui pengaruh tween 80 terhadap hewan uji setelah pemajanan karena tween digunakan sebagai pelarut ekstrak etanol daun kemangi. Klasifikasi kategori GHS memiliki arti seperti pada Tabel 3.2 berikut:

Tabel 3.2 Pernyataan ketoksikan kategori GHS

	Kategori 1	Kategori 2	Kategori 3	Kategori 4	Kategori 5
LD ₅₀ (mg/KgBB)	5	50	300	2000	5000
Pernyataan ketoksikan	fatal bila tertelan	fatal bila tertelan	Toksik bila tertelan	Bahaya bila tertelan	Mungkin bahaya bila tertelan

(sumber: United Nations Economic Commission for Europe, 2011)

Kategori 5 merupakan klasifikasi senyawa yang diharapkan mempunyai bahaya toksisitas akut yang relatif rendah namun dapat membahayakan populasi rentan pada kondisi tertentu. Senyawa ini diharapkan memiliki rentang LD₅₀ antara 2000 – 5000 mg/KgBB dengan kriteria:

- 1) senyawa diklasifikasikan pada kategori ini apabila telah terdapat bukti yang reliabel yang menunjukkan LD₅₀ di rentang kategori 5 atau uji pada penelitian hewan lain.

- 2) senyawa diklasifikasikan pada kategori ini melalui ekstrapolasi, estimasi, atau pengukuran jika penempatan ke kategori yang lebih bahaya tidak dapat dilakukan dan:
- a) informasi terpercaya menunjukkan efek toksik yang signifikan pada manusia; atau
 - b) terdapat kematian yang diamati ketika diuji hingga kategori 4 baik secara oral, inhalasi, atau rute dermal; atau
 - c) terdapat penilaian oleh ahli mengkonfirmasi bahwa terdapat gejala toksik yang signifikan ketika diuji hingga kategori 4 kecuali diare, piloereksi, atau hewan tampak tidak terawat; atau
 - d) terdapat ahli mengkonfirmasi bahwa terdapat informasi yang reliabel tentang potensial efek akut dari percobaan hewan lain.

Adanya kebutuhan untuk melindungi kesejahteraan hewan, pengujian pada rentang kategori 5 dicoba untuk dicegah dan hanya dipertimbangkan ketika terdapat kemungkinan kuat bahwa hasil yang dicapai akan mempunyai hubungan langsung untuk melindungi kesehatan manusia (United Nation, 2011)

c. *Limit Test* atau Uji Pembatasan

Pada pedoman ini apabila digunakan prosedur dengan uji pendahuluan pada dosis 2000 mg/KgBB kemudian diikuti uji utama dengan dosis 2000 mg/KgBB dengan hewan uji yang lain, maka prosedur ini merupakan uji pembatasan pada metode OECD 420 (OECD, 2001).

3.7.6 Pembuatan Preparat

Hewan uji baik yang mati setelah pajanan ekstrak namun sebelum 14 hari akan diterminasi dan langsung diambil organ ginjalnya kemudian dilakukan pembuatan preparat lalu dilakukan pemeriksaan histopatologi ginjal. Sedangkan hewan uji masih bertahan hidup pada hari ke-14 akan dikorbankan pada hari itu untuk diambil dan dilakukan pemeriksaan histopatologi organ ginjal. Hal tersebut dilakukan untuk menguji gejala toksisitas atau efek toksik yang tertunda. Hewan uji dikorbankan dengan metode inhalasi eter (Larasati *et al.*, 2016). Setelah itu

langsung dilakukan pembedahan untuk diambil organ ginjal. Organ ginjal difiksasi dalam larutan *buffered neutral formalin* 10% kemudian dibuat preparat ginjal di Laboratorium Patologi Anatomi RSD. dr. Soebandi Jember dengan protokol terlampir pada Lampiran D.

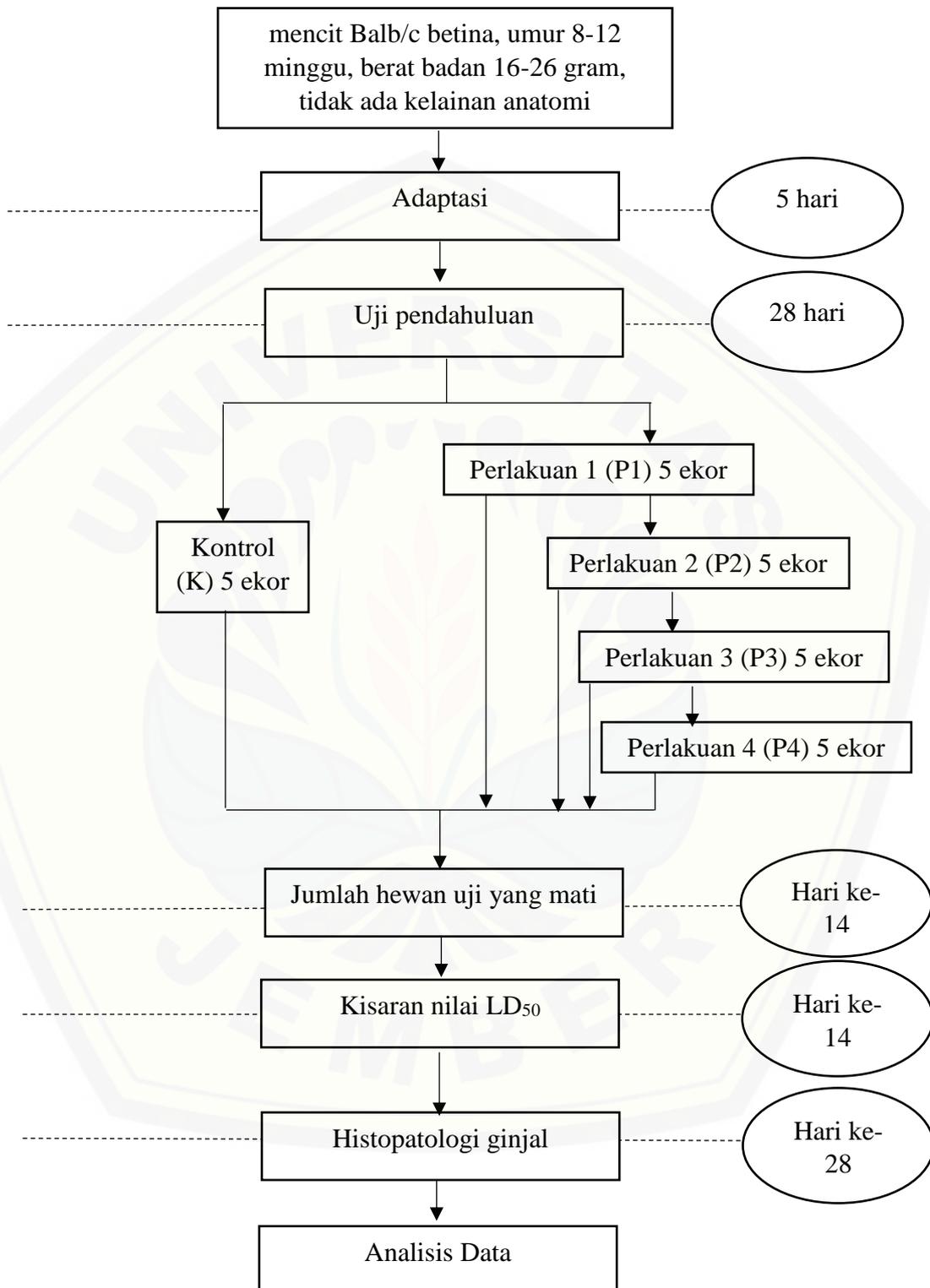
3.7.7 Pengamatan Efek Toksisitas Akut pada Histopatologi Ginjal

Pemeriksaan histopatologi ginjal dilakukan oleh dr. Rusdamayanti, Sp.PA dan mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah mempelajari histopatologi ginjal di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pengamatan dilakukan dengan metode *blinding*, dimana pemeriksa tidak mengetahui perlakuan yang diberikan pada hewan uji yang diperiksa. Preparat histopatologi ginjal diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali untuk melihat degenerasi tubulus, dilatasi tubulus proksimal, dan nekrosis sel pada 5 lapang pandang yang diambil dari keempat sudut dan bagian tengah preparat (Satyatami, 2014).

3.8 Analisis Data

Pengamatan dilakukan terhadap data hasil histopatologi organ. Dengan adanya perubahan pada organ akibat pemajanan hewan uji maka dapat diketahui potensi toksisitas akut bahan uji terhadap organ ginjal. Data skoring histopatologi ginjal merupakan data ordinal sehingga dilakukan uji nonparametrik *Mann-Whitney* dengan taraf kepercayaan 95%.

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Skema alur penelitian

Keterangan :

- K : kontrol (mencit Balb/c + tween 80)
- P1 : mencit Balb/c + ekstrak etanol daun kemangi dosis 2000 mg/KgBB
- P2 : mencit Balb/c + ekstrak etanol daun kemangi dosis 300 mg/KgBB
- P3 : mencit Balb/c + ekstrak etanol daun kemangi dosis 50 mg/KgBB
- P4 : mencit Balb/c + ekstrak etanol daun kemangi dosis 5 mg/KgBB

3.10 Uji Kelayakan Etik

Subyek penelitian yang digunakan adalah hewan uji mencit Balb/c yang dalam pelaksanaannya mendapat sertifikat kelayakan etik. Sertifikat kelayakan etik telah diterbitkan oleh komisi etik kedokteran yang terlampir pada Lampiran A dengan nomor 1.168/H25.1.11/KE/2017. Prosedur ini bertujuan untuk menjamin keamanan hewan uji dan peneliti, melindungi hewan uji serta memperjelas tujuan dan kewajiban peneliti.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) mempunyai kisaran LD₅₀ >2000 mg/KgBB.
2. Terdapat perubahan gambaran histopatologi ginjal mencit berupa lesi fokal setelah pajanan akut ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) pada dosis 2000 mg/KgBB.

5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas subakut oral, uji toksisitas subkronis oral, dan uji toksisitas kronis oral ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) diperlukan agar dapat dilanjutkan ke uji klinis.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinata, M.O., I. W. Sudira dan I. K. Berata. 2012. Efek ekstrak daun ashitaba (*angelica keiskei*) terhadap gambaran histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) Jantan. *Buletin Veteriner Udayana*. 4(2): 55-62.
- Algayerofa, O. 2011. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. 4th Rev. New York: United Nations Economic Comission for Europe.
- Ali, A., M. Qasim, M. N. Aftab, S. M. Azam, F. Iqbal, S. Akram, and M. Z. Hussain. 2017. Effects of ocimum basilicum extract on hematological and serum profile of male albino mice after AlCl3 induced toxicity. *Pure and Applied Biology*. 6(2): 505-510.
- Apostolova N, Victor N.M. 2015. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. *Antioxid Redox Signal*. 22: 686-729.
- Carocho, M., and I.C.F.R. Ferreira. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 51: 5–25.
- Chinedu, E., D. Arome and F. S. Ameh. 2013. A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicology international*. 20(3): 224-226.
- Cotoras M., H. Vivanco, R. Melo, M. Aguirre, E. Silva, and L. Mendoza. 2014. In vitro and in vivo evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (*vitis vinifera*) pomace. *Molecules* 19: 21154–21167.
- Eghbaliferiz, S., and M. Iranshahi. 2016. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytother. Res*. 2016.
- Eroschenko, Victor P. 2008. *Atlas Histologi diFiore dengan Korelasi Fungsional*. Edisi 11. Jakarta: EGC.
- Fathurrachman, D.A. 2014. Pengaruh Konsentrasi Pelarut terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan Metode Peredaman Radikal Bebas DPPH. *Skripsi*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Fogo, A. B., M. A. Lusco, B. Najafian, and C. E. Alpers. 2016. AJKD atlas of renal pathology: toxic acute tubular injury. *American Journal of Kidney Disease*. 67(6): e31-e32.

- Gautam, M. K., and R. K. Goel. 2014. Toxicological study of *ocimum sanctum* linn leaves: hematological, biochemical, and histopathological studies. *Journal of Toxicology*. 2014: 1-9.
- Gupta, I.R on Jackson Laboratory. 2017. Phenotype Measure Percent Kidney Weight to Body Weight. <https://phenome.jax.org/measures/39105>. [diakses pada 3 Januari 2018].
- Gurria, A. 2001. *OECD Guideline For Testing Of Chemicals Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure*. Paris: OECD.
- Gurria, A. 2017. OECD Guidelines for The Testing of Chemical. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemical.htm>. [diakses pada 2 Mei 2017].
- Hodgson, E. 2004. *A Textbook of Modern Toxicology*. Canada: John Wiley & Sons, Inc. Publication.
- Jayant, Shiv Kumar and N. Srivastava. 2016. Effect of *Ocimum sanctum* against alloxan induced diabetes and biochemical alterations in rats. *Integrative Obesity and Diabetes journal* 2(5): 1-49.
- Kacker, Sundeep., A. K. Gupta, A. K. Sharma, S. Lata and R. Sharma. 2013. A study on the activity of *swertia chirata* and *ocimum sanctum* in animal model of arthritis. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*. 2(23): 4058-4069.
- Kopaei, R. M. 2012. Medicinal plants and the human needs. *J HerbMed Pharmacol*. 1(1): 1–2.
- Kopaei, R. M., dan A. Baradaran. 2013. Plants antioxidants: from laboratory to clinic. *J Nephrothol*, 2(2): 152–153.
- Larasati, R., B. Wirjatmadi, dan M. Adriani. 2016. Pengaruh pemberian *trans fatty acid* (TFA) dari margarin dan minyak kelapa sawit yang dipanaskan berulang terhadap kadar glukosa darah puasa pada tikus wistar. *The Indonesian Journal of Public Health*. 11(1): 69–77.
- Mahajan, N., J. Singh and S. Sinha. 2014. Comparison of total flavonoid, phenolic content, and antioxidant capacity in leaf and seed extracts from white holy basil (*Ocimum sanctum*). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 5(4): 34-42.
- Matsuura H.N., M. R. Rau, and A. G. Fett neto. 2014. Oxidative stress and production of biactive monoterpene indole alkaloids: biotechnological implication. *Biotechnol lett*. 36: 191-200.

- Mundey, M. K., M. Roy, S. Roy, M. K. Awasthi and R. Sharma. 2013. Antioxidant potential of *ocimum sanctum* in arsenic induced nervous tissue damage. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 6(3): 95 – 101.
- Muntiha, M. 2001. Teknik pembuatan preparat histopatologi dari jaringan hewan dengan pewarnaan hematoksilin dan eosin (H&E). *Temu Fungsional Non Peneliti*. 2001: 156-163.
- Pandhey, G. and S. Madhuri. 2010. Pharmacological activities of *ocimum sanctum* (tulsi): a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 5(009):1.
- Panjaitan, Richard. 2007. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 381/Menkes/SK/III/2007 *Kebijakan Obat Tradisional Nasional Tahun 2007*. 27 Maret 2007. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Parasuraman, S. 2011. Toxicological screening. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 2(2): 74-79.
- Pattanayak, P., P. Behera, D. Das, and S.K. Panda. 2010. *Ocimum sanctum* linn. A reservoir plant for therapeutic application: an overview. *Pharmacognosy review*. 4(7): 95-105.
- Price, S. A dan L. M. Wilson. 2002. *Pathophysiology: Clinical Concepts of Diseases Processes*. Amsterdam: Elsevier science. Terjemahan oleh B. U. Pedit, H. Hartanto, P. Wulansari dan D. A. Mahanani. 2005. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi 6. Jakarta: EGC.
- Purnomo, Basuki B. 2011. *Dasar – dasar urologi*. Edisi 3. Jakarta: Sagung Seto.
- Putri, A. Y., dan M. Thaha. 2014. Role of oxidative stress on chronic kidney disease progression. *Acta Medica Indonesiana - The Indonesian Journal of Internal Medicine*. 46(3): 244-252.
- Rahman, A., I. Rezuanul, M. Kamruzzaman, K. Alam and A. Mastofa Jamal. 2011. *Ocimum sanctum* L.: A review of phytochemical and pharmacological profile. *American Journal Of Drug Discovery and Development*.
- Raina, P., C. V. Chandrasekaran, M. Deepak, A. Aggarwal and K.G. Ruchika. 2015. Evaluation of subacute toxicity of methanolic/aqueous preparation of aerial parts of *o. Sanctum* in wistar rats: clinical, hematological, biochemical and histopathological studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 175:509-517.

- Rameshthangam, P., and J. P. Chitra. 2016. Synergistic anticancer effect of green synthesized nickel nanoparticles and quercetin extracted from *Ocimum sanctum* leaf extract. *Journal of Materials Science & Technology*.
- Rana, M., A. Sayeed, S. Nasrin, M. Islam, M. Rahman and M. F. Alam. 2015. Free radical scavenging potential and phytochemical analysis of leaf extract from *Ocimum sanctum* Linn. *Journal of Agricultural Technology* 2015. 11(7):1615-1623.
- Rider, G. 2001. International Labour Organization. Acute Toxicity. <http://www.ilo.org/legacy/english/protection/safework/ghs/ghsfinal/ghsc05.pdf>. [diakses pada 5 Januari 2018].
- Rosen, Seymour and I. E. Stillman. 2008. Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation. *Journal of American Society Nephrology*. 19: 871–875.
- Sadashiv, P. S. 2010. Acute toxicity study of *Ocimum sanctum*. *International Research Journal of Pharmacy*. 1(1): 403-409.
- Safitri, E.E. 2016. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) Sebagai Hepatoprotektor terhadap Kadar MDA Hati Hewan uji yang Diinduksi Isoniazid. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Sasmito, W.A., A.D. Wijayanti, I. Fitriana dan P.W. Sari. 2015. Pengujian toksisitas akut obat herbal pada hewan uji berdasarkan *organization for economic co-operation and development* (OECD). *Jurnal Saint Veteriner*. 33(2): 234-239.
- Satyatami, Mentari. 2014. Pengaruh Paparan Per Oral Fluorida dalam Pasta Gigi Dengan Dosis Bertingkat terhadap Gambaran Mikroskopis Ginjal Mencit Balb/C Usia 3-4 Minggu. *Skripsi*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Sharwan, G., P. Jain, R. Pandey, and S. S. Shukla. 2015. Toxicity profile of traditional herbal medicine. *Journal of ayurvedic and herbal medicine*. 1(3): 81-90.
- Sherley. 2008. *Taksonomi Koleksi Tanaman Obat Kebun Tanaman Obat Citeureup*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Shetty, S., S. Udupa, and L. Udupa. 2008. Evaluation of antioxidant and wound healing effects of alcoholic and *aqueous* extract of *ocimum sanctum* linn in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 5(1): 95-101.

- Shirzad, H., F. Taji, and M. Rafieian-Kopaei. 2011. Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in balb/c mice. *J Med Food*, 14(9): 969–974.
- Siva, M., K. R. Shanmugam, B. Shanmuga, G. V. Subbaiah, S. Ravi, K. S. Reddy, K. Mallikarjuna. 2016. *Ocimum sanctum*: a review on the pharmacological properties. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 5(3): 558-565.
- Small, D. M., J.S. Coombes, N. Bennet, D. W. Johnson, and G. C. Gobe. 2012. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology Asian Pacific Society of Nephrology*. 17(4): 311–321.
- Sparringa, R. A. 2014. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014. *Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis Secara In Vivo*. 2014. Badan pengawas obat dan makanan. Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 875. Jakarta: BPOM RI.
- Suhita, L. P. R., I. W. Sudira dan I. B. O. Winaya. 2013. Histopatologi ginjal tikus putih akibat pemberian ekstrak pegagan (*centella asiatica*) peroral. *Buletin Veteriner Udayana*. 5(1): 63-69.
- Syamsuhidayat, S. S. dan J. R. Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia. Jilid I*. Jakarta: Balitbangkes Depkes RI.
- Trihono. 2010. *Riset Kesehatan Dasar 2010*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI.
- Utomo, B. P. S., E. P. Hestianah, dan J. Soepraptini. 2017. Gambaran histologis hepar mencit jantan (*mus musculus*) yang diberi ekstrak ethanol propolis. *Veterina Medika*. 10(1).
- Wibowo, R., Zulfikar, H. Paramu, D. Rato, H. S. Addy, E. Sulistyaningsih, S. Bukhori, A. Tallapessy, N. D. Gianawati, Siswoyo, A. Rijadi, dan Nawiyanto. 2016. *Pedoman Penulisan Karya Ilmiah*. Jember: UPT Penerbitan Universitas Jember.
- Winarsih, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Yordi, E.G., Pérez, E.M., Matos, M.J., and Villares, E.U. 2012. Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure–activity relationship evidence. *Nutrition, Well-Being and Health*. 23-48.

LAMPIRAN

LAMPIRAN A. ETHICAL CLEARANCE

A.1a Halaman pertama lembar persetujuan etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

ETHICAL APPROVA

Nomor : 1. 169 /H25.1.11/KE/2017

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI (*Ocimum sanctum*)
DILIHAT DARI NILAI LD₅₀ DAN HISTOPATOLOGI GINJAL**

Nama Peneliti Utama : Khana Nurfadhila
Name of the principal investigator

NIM : 142010101034

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 20 Oktober 2017
Ketua Komisi Etik Penelitian


dr. Rini Riyanti, Sp.PK

A.1b Halaman kedua lembar persetujuan etik

Tanggapan Anggota Komisi Etik

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

Review Proposal :

- Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada buku pedoman etik penelitian kesehatan (Penggunaan hewan coba dengan prinsip 3R : *Reduced, Reused, Redefined*)
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak etanol Daun Kemangi agar didapatkan kadar yang diinginkan.
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan dan pembacaan preparat histopatologi ginjal agar didapat sediaan yang memenuhi syarat pembacaan.
- Pembacaan preparat histopatologi ginjal dilakukan oleh orang yang kompeten, minimal oleh 2 orang serta menggunakan metode blinding.
- Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan

Mengetahui
Ketua Komisi Etik Penelitian



dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Jember, 10 Oktober 2017

Reviewer

dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed

LAMPIRAN B. SURAT IDENTIFIKASI TANAMAN KEMANGI
B.1a Halaman Pertama Surat Identifikasi Tanaman Kemangi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
Jl. Kalimantan Kampus Tegalboto, Jember 68121;
Telp.: (0331) 334054, Fax.: (0331) 338422, e-mail: soedradjad.faperta@unej.ac.id
www.unej.ac.id

Nomor : 055/UN25.1.3/BP/PS.8/2017
Lampiran : 2 (lembar) lembar
Hal : Hasil Identifikasi Tumbuhan

18 September 2017

Yth. : Pembantu DEKAN I
Fakultas Kedokteran
Universitas Jember

Menindaklanjuti surat saudara Nomor: 1569/UN25.1.11/LT/2017, tanggal 6 September 2017 tentang Permohonan Ijin Penelitian untuk identifikasi tanaman, maka bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi morfologis 1 (satu) set contoh tanaman lengkap yang terdiri dari daun, batang, akar, dan buah beserta isinya (terlampir) dalam rangka penyusunan skripsi, atas nama:

1. Khana Nurfadhila (NIM. 142010101034), dan
2. Hafid Aji Prasetyo (NIM. 142010101075).

Atas kepercayaannya disampaikan terimakasih.



Ketua

Ir. B. Soedradjad, M.T.
NIP. 195707181984031001

Tembusan:

1. Dekan Fakultas Pertanian UNEJ (sebagai Laporan)
2. Mahasiswa yang bersangkutan

B.1b Halaman Kedua Surat Identifikasi Tanaman Kemangi

HASIL IDENTIFIKASI MORFOLOGIS CONTOH TUMBUHAN

1. MORFOLOGI DAUN	
a. Bangun Daun	Bulat telur (<i>ovatus</i>)
b. Tepi Daun	Bergerigi (<i>Serratus</i>)
c. Pangkal Daun	Runcing (<i>acutus</i>)
d. Ujung Daun	Runcing (<i>acutus</i>)
e. Tulang Daun	Menyirip (<i>Penninervis</i>) berhadapan
f. Warna Ibu Tulang Daun	Kuning kehijauan
g. Permukaan Atas	Berbulu halus (<i>Villosus</i>) rapat
h. Permukaan Bawah	Berbulu halus (<i>Villosus</i>) rapat
i. Warna Daun	Hijau Tua (bagian atas) dan Hijau Muda (bagian bawah)
j. Duduk Daun	Bersilang
k. Rumus Daun	-
l. Jenis Daun	Tunggal (<i>Folium Simplex</i>)
2. MORFOLOGI BATANG	
a. Bentuk Batang	Segi Empat dan Beralur
b. Permukaan Batang	Berbulu Halus
c. Arah Tumbuh	Ke atas
d. Percabangan	
3. MORFOLOGI AKAR	
Sistem perakaran	Tunggang
4. MORFOLOGI BUNGA	
a. Jenis Bunga	Majemuk
b. Bentuk Bunga	Tandan
c. Permukaan Bunga	Berbulu pendek
d. Warna bunga	Hijau
e. Bentuk Mahkota Bunga	Bulat telur
5. MORFOLOGI BUAH	Tanaman belum berbuah
6. MORFOLOGI BIJI	Tanaman belum berbiji
7. MODIFIKASI ORGAN	
a. Jenis Modifikasi	Tidak ada
b. Lain-Lain	Tidak ada

Catatan:

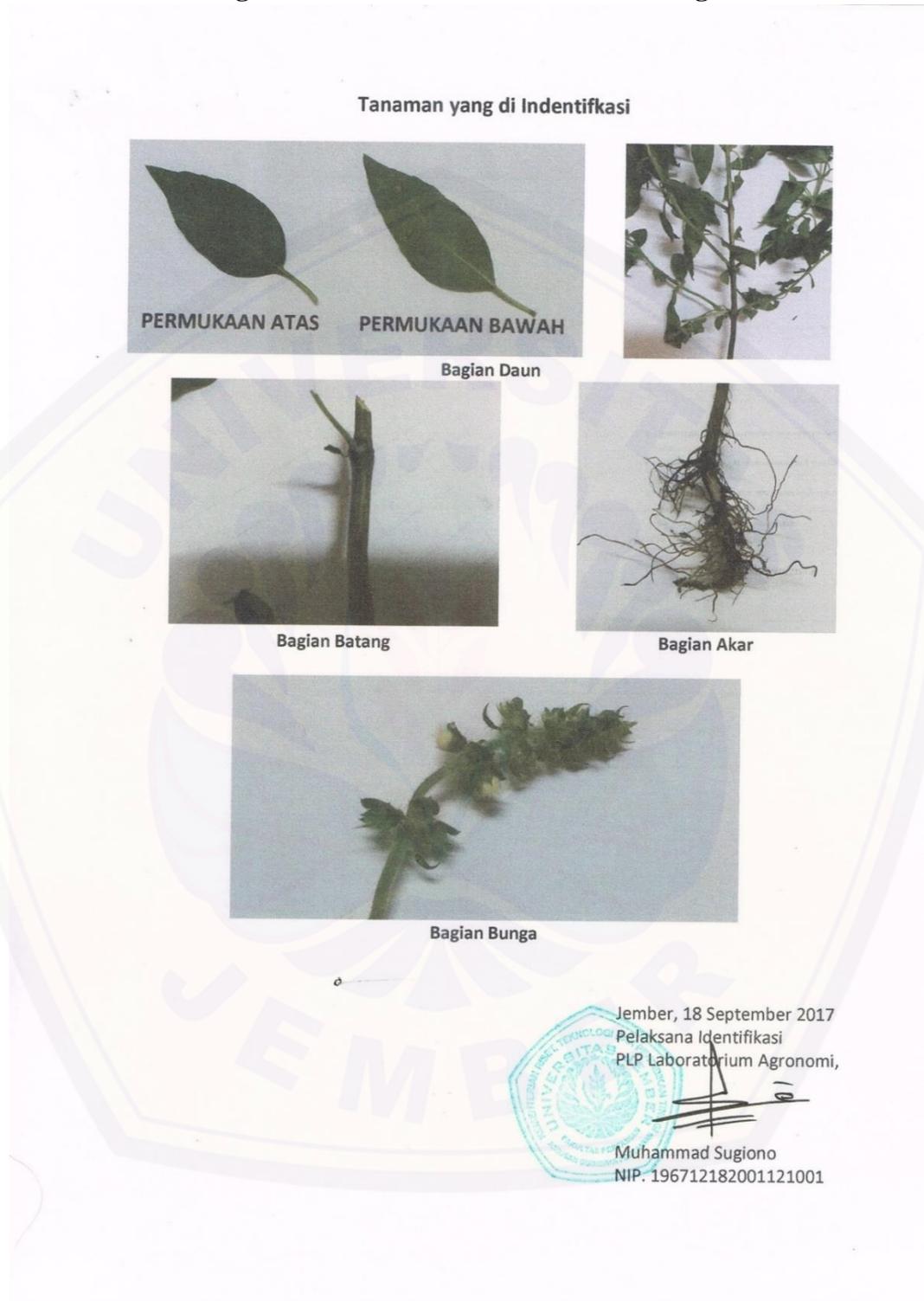
1. Tumbuhan yang diidentifikasi hanya berupa tanaman lengkap dengan akar, batang, daun, dan bunga.
2. Berdasar ciri morfologis, khususnya pada karakter akar, batang, daun, dan bunga dapat disimpulkan bahwa tumbuhan adalah Kemangi (*Ocimum sanctum*) var lokal.

Jember, 18 September 2017
Pelaksana Identifikasi
PLP Laboratorium Agronomi,



Muhammad Sugiono
NIP. 196712182001121001

B.1c Halaman Ketiga Surat Identifikasi Tanaman Kemangi



LAMPIRAN C. TABEL DOSIS PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI

Pemberian dosis ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sacntum*)

- Dosis 300mg/KgBB pada uji pendahuluan

$$\text{Konversi dosis mencit BB 20g} = \frac{300 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{20 \text{ g}}$$

$$X= 6 \text{ mg}$$

- Dosis 2000mg/KgBB pada uji pendahuluan

$$\text{Konversi dosis mencit 2000mg/KgBB} = \frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{20 \text{ g}}$$

$$X= 40 \text{ mg}$$

- Dosis 2000mg/KgBB pada uji utama

No.	Berat badan mencit (gram)	Dosis ekstrak yang diberikan (mg)
1.	19	38
2.	20	40
3.	21	42
4.	22	44
5.	23	46

LAMPIRAN D. PROTOKOL PEMBUATAN PREPARAT

Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E)

CARA KERJA

Persyaratan dalam melakukan pengambilan sampel:

1. sampel untuk pemeriksaan histopatologi harus segar, artinya jaringan diambil secepat mungkin setelah hewan mati. Keterlambatan pengambilan jaringan, terlebih dalam suhu lapangan yang panas, mengakibatkan jaringan cepat menjadi busuk.
2. ukuran jaringan yang diambil sekitar 1 cm³. Jaringan harus segera difiksasi. Potongan jaringan yang terlalu besar mengakibatkan jaringan yang terletak di dalamnya tidak terfiksasi dengan sempurna, sehingga dapat autolisis.

Fiksasi dilakukan merendam jaringan dengan larutan formalin 10%. Biasanya dilakukan dengan cara merendam jaringan di dalam zat-zat kimia yang berfungsi sebagai bahan pengawet agar terhindar dari pencernaan jaringan oleh enzim-enzim (autolisis) atau bakteri dan untuk melindungi struktur fisik sel. Bahan pengawet yang rutin digunakan adalah larutan *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10% dengan pH berkisar antara 6.5 - 7.5. pH ideal adalah 7.0. Agar fiksasi jaringan dengan larutan tersebut berlangsung sempurna, maka perbandingan antara organ dan larutan yaitu 1:10, sedangkan lamanya fiksasi minimal 2 hari.

Proses Pembuatan Preparat Histopatologi

1. Memotong jaringan organ
Setelah jaringan organ yang berada di dalam larutan fiksatif matang, jaringan ditiriskan pada saringan selanjutnya dipotong menggunakan pisau scalpel dengan ketebalan 0,3 - 0,5 mm dan disusun ke dalam *tissue cassette*, kemudian sejumlah *tissue cassette* dimasukkan ke dalam keranjang khusus (basket).
2. Proses dehidrasi
Keranjang (*basket*) yang di dalamnya berisi jaringan organ, dimasukkan ke dalam mesin prosesor otomatis. Selanjutnya jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap dengan putaran waktu sebagai berikut: alkohol 70% (2 jam), alkohol 80% (2 jam), alkohol 90% (2 jam), alkohol absolute (2 jam), alkohol absolut (2 jam), xylol (2 jam), parafin cair (2 jam). Selanjutnya keranjang yang berisi *tissue cassette* dikeluarkan untuk dilakukan proses berikutnya.
3. Mencetak blok parafin
Cetakan dari bahan stainless steel dihangatkan di atas api Bunsen, lalu ke dalam setiap cetakan dimasukkan jaringan sambil diatur dan sedikit ditekan. Sementara ditempat lain telah disiapkan parafin cair dalam tempat khusus, sehingga dicapai suhu 60°C. Parafin cair tersebut dituangkan ke dalam jaringan sampai seluruh jaringan terendam parafin. Parafin dibiarkan membeku di atas mesin pendingin. Selanjutnya blok parafin

dilepas dari cetakan dan disimpan di *freezer* (-20°C) sebelum dilakukan pemotongan.

4. Memotong blok jaringan

Blok parafin yang mengandung jaringan, kemudian dipotong dengan menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan berkisar 3 - 4µm. Potongan tersebut diletakkan secara hati-hati di atas permukaan air dalam waterbath bersuhu 46° C. Pada kesempatan ini bentuk irisan dirapikan, kemudian diletakkan di atas kaca obyek yang di atasnya disusun di dalam rak khusus dan dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 60°C sampai preparat siap untuk diwamai.

PROSES PEWARNAAN HEMATOKSILIN DAN EOSIN

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan dengan waktu sebagai berikut

Xylol	3	Menit
Xylol	3	Menit
Alkohol absolut	3	Menit
Alkohol absolut	3	Menit
Alkohol 90%	3	Menit
Alkohol 80%	3	Menit
Bilas dengan air keran	1	Menit
Larutan hematoksilin	6-7	Menit
Bilas dengan air keran	1	Menit
Larutan pembiru	1	Menit
Air keran	1	Menit
Larutan eosin	1-5	Menit
Bilas dengan air keran	1	Menit
Alkohol 80%	10	Celupan
Alkohol 90%	10	Celupan
Alkohol absolute	10	Celupan
Alkohol absolute	1	Menit
Xylol	3	Menit
Xylol	3	Menit
Xylol	3	Menit

Preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan perekat (DPX) dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup. Hasil pewarnaan dapat dilihat di bawah mikroskop

*) Muntiha, M. 2001. Teknik pembuatan preparat histopatologi dari jaringan hewan dengan pewarnaan hematoksilin dan eosin (H&E). *Temu Fungsional Non Peneliti*. 2001: 156-163

LAMPIRAN E. DATA PENELITIAN**E.1 Pengamatan Bukti Toksisitas****Kelompok kontrol**

Pengamatan mencit	30 menit					4 jam					24 jam				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
berjalan menggunakan perut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>discharge</i> dari hidung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
menyiksa diri sendiri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
perdarahan di orifisium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): tidak terjadi

Pengamatan mencit	Hari ke-2					Hari ke-3					Hari ke-4				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
berjalan menggunakan perut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>discharge</i> dari hidung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
menyiksa diri sendiri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
perdarahan di orifisium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): tidak terjadi

Pengamatan mencit	Hari ke-5					Hari ke-6					Hari ke-7				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
berjalan menggunakan perut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>discharge</i> dari hidung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
menyiksa diri sendiri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
perdarahan di orifisium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): tidak terjadi

Pengamatan mencit	Hari ke-8					Hari ke-9					Hari ke-10				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
berjalan menggunakan perut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>discharge</i> dari hidung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
menyiksa diri sendiri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
perdarahan di orifisium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): tidak terjadi

Pengamatan mencit	Hari ke-11					Hari ke-12					Hari ke-13				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
berjalan menggunakan perut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>discharge</i> dari hidung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
menyiksa diri sendiri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
perdarahan di orifisium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): tidak terjadi

Pengamatan mencit	Hari ke-14				
	1	2	3	4	5
berjalan menggunakan perut	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-
<i>discharge</i> dari hidung	-	-	-	-	-
menyiksa diri sendiri	-	-	-	-	-
perdarahan di orifisium	-	-	-	-	-

(-): tidak terjadi

Kelompok perlakuan dosis 2000mg/KgBB

Pengamatan mencit	30 menit					4 jam					24 jam				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
berjalan menggunakan perut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>discharge</i> dari hidung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
menyiksa diri sendiri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
perdarahan di orifisium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): tidak terjadi

Pengamatan mencit	Hari ke-2					Hari ke-3					Hari ke-4				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
berjalan menggunakan perut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>discharge</i> dari hidung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
menyiksa diri sendiri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
perdarahan di orifisium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): tidak terjadi

Pengamatan mencit	Hari ke-5					Hari ke-6					Hari ke-7				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
berjalan menggunakan perut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>discharge</i> dari hidung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
menyiksa diri sendiri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
perdarahan di orifisium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): tidak terjadi

Pengamatan mencit	Hari ke-8					Hari ke-9					Hari ke-10				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
berjalan menggunakan perut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>discharge</i> dari hidung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
menyiksa diri sendiri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
perdarahan di orifisium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

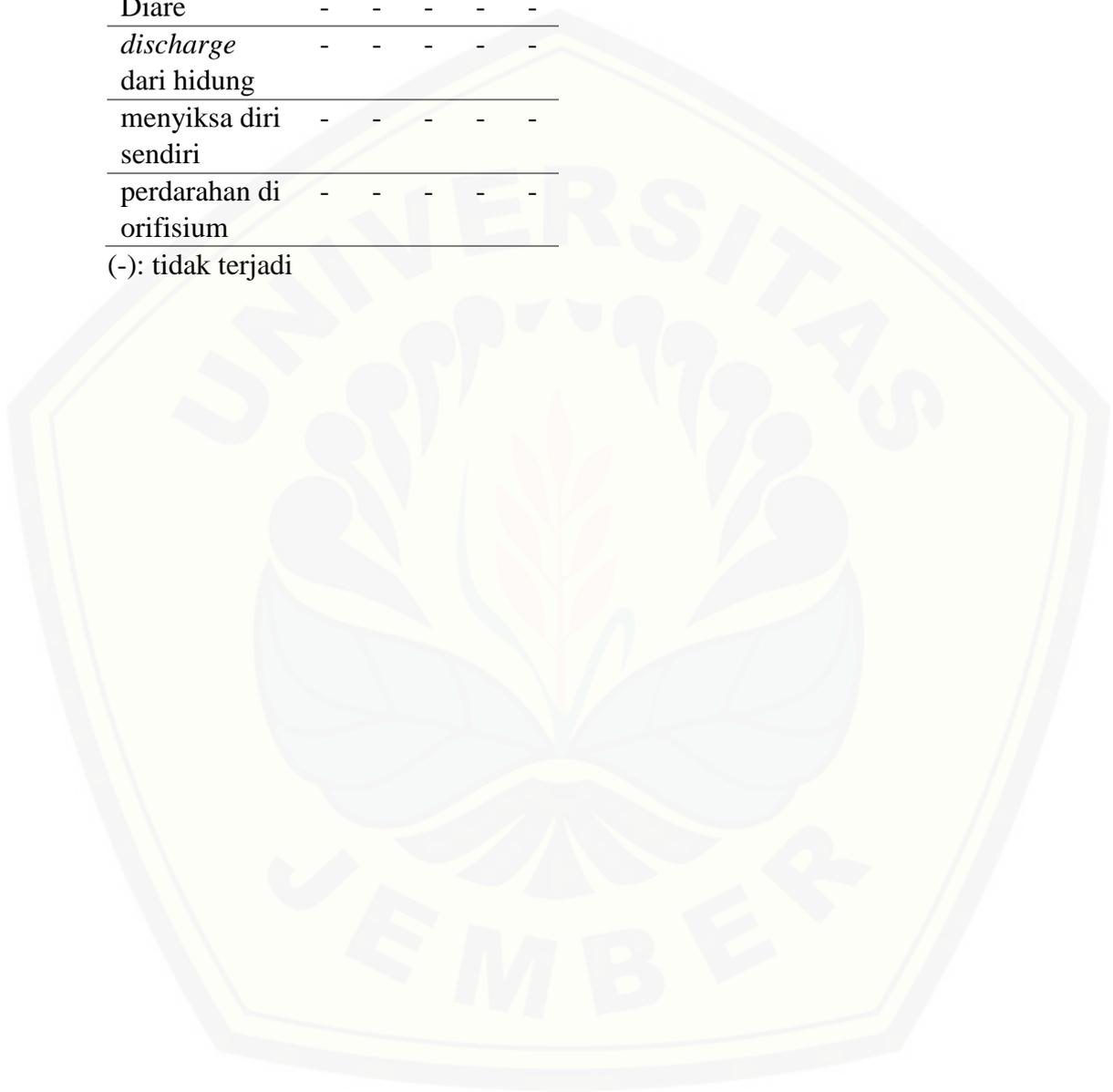
(-): tidak terjadi

Pengamatan mencit	Hari ke-11					Hari ke-12					Hari ke-13				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
berjalan menggunakan perut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>discharge</i> dari hidung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
menyiksa diri sendiri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
perdarahan di orifisium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): tidak terjadi

Pengamatan mencit	Hari ke-14				
	1	2	3	4	5
berjalan menggunakan perut	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-
<i>discharge</i> dari hidung	-	-	-	-	-
menyiksa diri sendiri	-	-	-	-	-
perdarahan di orifisium	-	-	-	-	-

(-): tidak terjadi



E.2 Skoring Histopatologi GinjalHasil Pembacaan oleh *blind* 1

dr. RUSDAMAYANTI, Sp.PA

NO SIP : 002/13/Dinkes/Dr/1/2017

Jl. Gajahmada No. B 3-4 Bojonegoro

Hasil Pembacaan Histopatologi Ginjal

No.	Kelompok	Hasil Skoring
1	Kontrol 1	0
2	Kontrol 2	0
3	Kontrol 3	0
4	Kontrol 4	0
5	Kontrol 5	0
6	Perlakuan 1	1
7	Perlakuan 2	0
8	Perlakuan 3	1
9	Perlakuan 4	1
10	Perlakuan 5	1

Bojonegoro, 24 November 2017

Dokter Pemeriksa,


Dr. Rusdamayanti SpPA
Spesialis Patologi Anatomi

Dr. Rusdamayanti, Sp.PA

Hasil Pembacaan oleh *Blind 2*

Preparat H&E	Lapang Pandang	Skor	Rerata
Kontrol 1	1	0	0
	2	0	
	3	0	
	4	0	
	5	0	
Kontrol 2	1	0	0
	2	0	
	3	0	
	4	0	
	5	0	
Kontrol 3	1	0	0
	2	0	
	3	0	
	4	0	
	5	0	
Kontrol 4	1	0	0
	2	0	
	3	0	
	4	0	
	5	0	
Kontrol 5	1	0	0
	2	0	
	3	0	
	4	0	
	5	0	

Perlakuan 1	1	0	0,6
	2	0	
	3	1	
	4	1	
	5	1	
Perlakuan 2	1	0	0
	2	0	
	3	0	
	4	0	
	5	0	
Perlakuan 3	1	1	0,8
	2	1	
	3	1	
	4	0	
	5	1	
Perlakuan 4	1	1	1
	2	1	
	3	1	
	4	1	
	5	1	
Perlakuan 5	1	1	1
	2	1	
	3	1	
	4	1	
	5	1	

*) pengelompokan kontrol dan perlakuan dilakukan oleh peneliti setelah didapatkan hasil dari pengamat yang mengamati preparat yang telah diberi kode A-J.

LAMPIRAN F. ANALISIS DATA

Statistik Deskriptif Rerata Kelompok

	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
skor kelompok kontrol	5	,00	,00	,0000	,00000	,00000
skor kelompok perlakuan	5	,00	1,00	,7400	,18868	,42190
Valid N (listwise)	5					

Uji Mann-Whitney

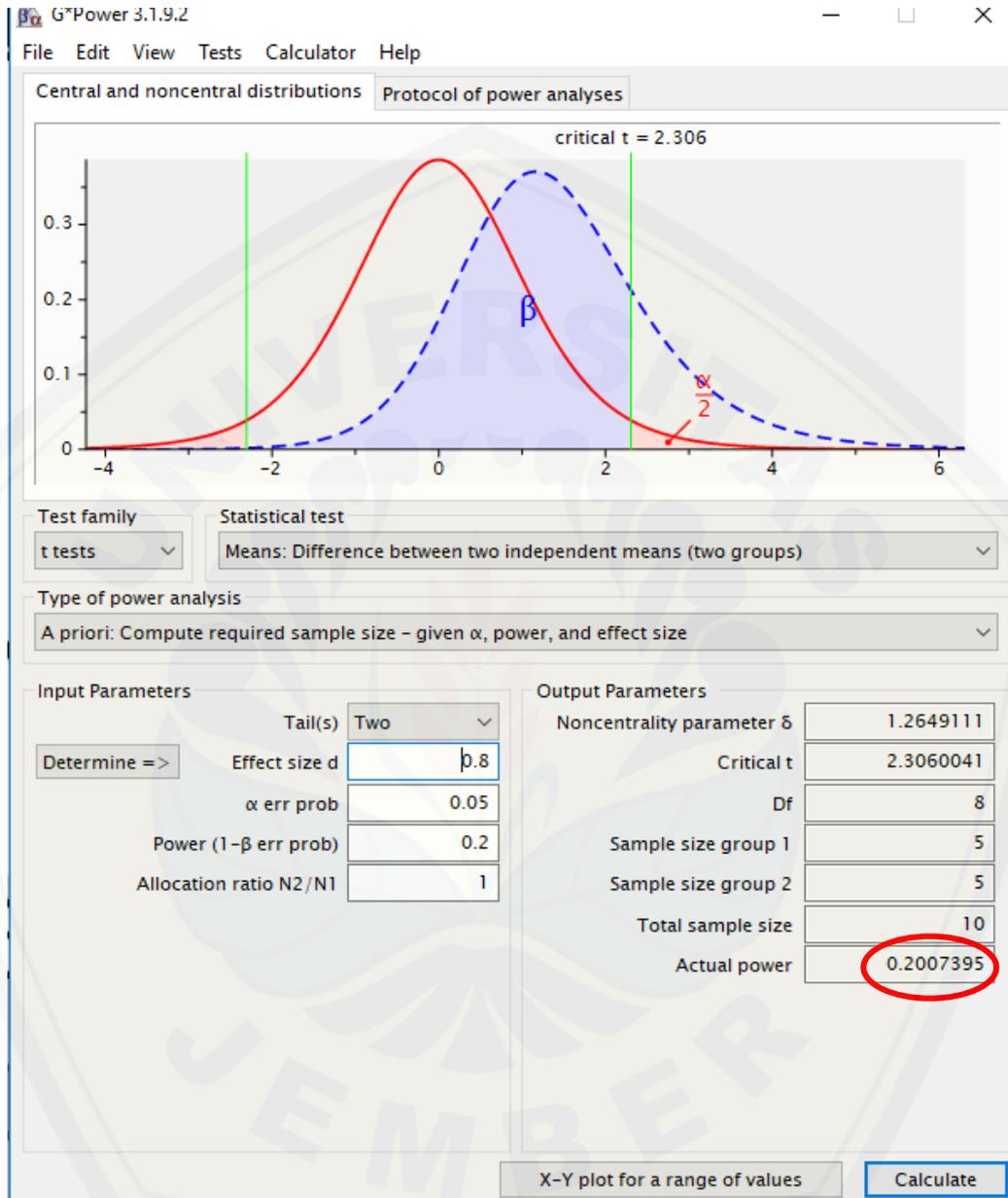
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
hasil histopatologi ginjal	kontrol	5	3,50	17,50
	perlakuan	5	7,50	37,50
	Total	10		

	hasil histopatologi ginjal
Mann-Whitney U	2,500
Wilcoxon W	17,500
Z	-2,362
Asymp. Sig. (2-tailed)	,018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,032 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

Perhitungan Power of Analysis menggunakan G*Power 3.1.9.2



LAMPIRAN G. DOKUMENTASI PENELITIAN



Kemangi yang Didapatkan dari Dusun Ragang Timur Desa Sukowono, Jember

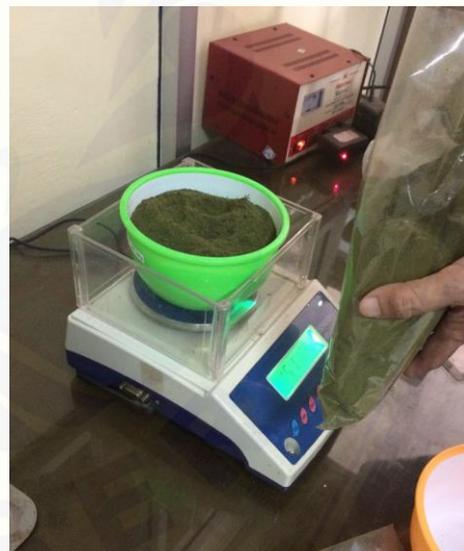


Adaptasi Hewan Uji

Proses Ekstraksi Daun Kemangi



Pengeringan Daun Kemangi



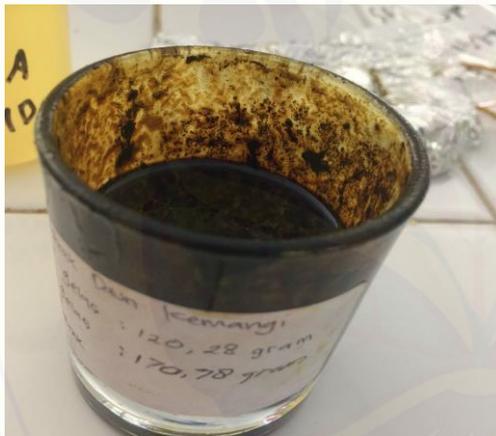
Penimbangan Serbuk Daun Kemangi



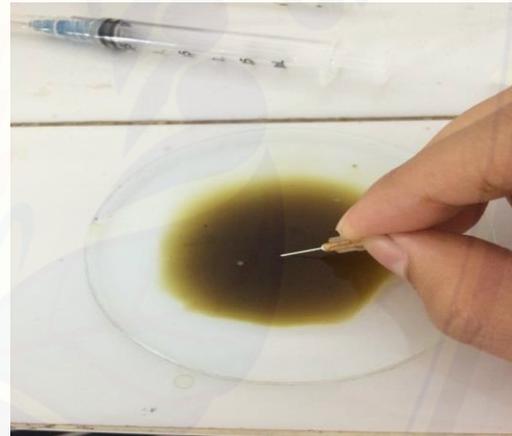
Proses Maserasi dengan Pelarut Etanol 70%



Proses evaporasi etanol 70% dengan *rotatory evaporator*



Ekstrak Semi Solid Etanol Daun Kemangi



Melarutkan Ekstrak Dengan Tween 80

Uji Toksisitas Akut Metode OECD 420



Uji Pendahuluan Pada Dosis
300mg/KgBB



Uji Pendahuluan Pada Dosis
2000mg/KgBB



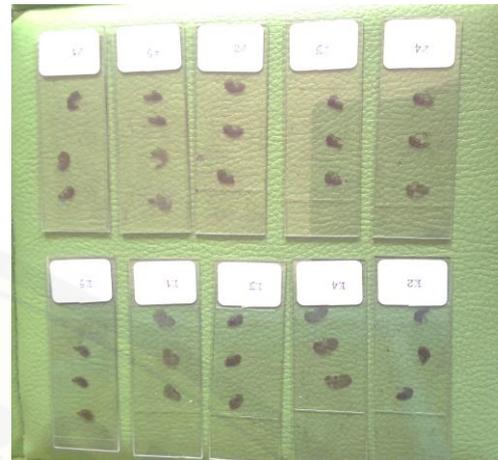
Uji Utama Pada Dosis 2000mg/KgBB



Anestesi Hewan Uji Untuk Pengambilan
Organ Ginjal



Pembedahan Mencit Untuk Diambil Organ Ginjal



Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin Pada Organ Ginjal



Pengamatan organ ginjal secara makroskopik kelompok kontrol



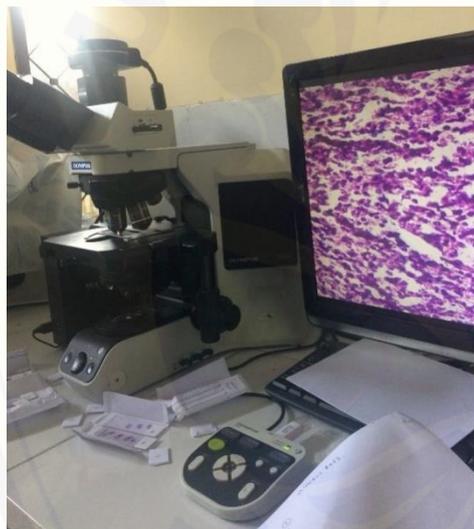
Pengamatan organ ginjal secara makroskopik kelompok kontrol



Pengamatan organ ginjal secara makroskopik kelompok perlakuan



Pengamatan organ ginjal secara makroskopik kelompok perlakuan



Pengamatan histopatologi ginjal dengan mikroskop Olympus BX53