



**KETOKSIKAN AKUT KOMBINASI EKSTRAK DAUN JATI BELANDA
(*Guazuma ulmifolia* Lmk.) DAN KELOPAK BUNGA ROSELLA (*Hibiscus
sabdariffa* L.) DENGAN PARAMETER HISTOPATOLOGI ORGAN
TIKUS PUTIH JANTAN GALUR WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Oleh

Novia Hilma

NIM 122210101043

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2016



**KETOKSIKAN AKUT KOMBINASI EKSTRAK DAUN JATI BELANDA
(*Guazuma ulmifolia* Lmk.) DAN KELOPAK BUNGA ROSELLA (*Hibiscus
sabdariffa* L.) DENGAN PARAMETER HISTOPATOLOGI ORGAN
TIKUS PUTIH JANTAN GALUR WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

Novia Hilma

NIM 122210101043

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2016

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT. Tuhan yang Maha Esa dan Nabi Muhammad SAW.;
2. Ayahanda Shonhaji, Ibunda Holifah, Saudari Hanik Kholifah dan Keluarga tercinta yang senantiasa memberikan doa, dukungan, bimbingan, kasih sayang tiada henti serta pengorbanan yang telah dilakukan setiap waktu;
3. Guru-guru yang selama ini telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadikan saya manusia yang berilmu dan bertakwa;
4. Almamater yang saya banggakan, Fakultas Farmasi Universitas Jember

MOTO

Sebaik-baiknya manusia adalah mereka yang bermanfaat bagi orang lain
(Rosulullah SAW.)^{*)}

Sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan (terjemahan Q.S. Al –
Insyirah ayat 5)^{**)}

Seandainya hidupmu selalu indah, mungkin kau tidak akan mengenal gigihnya bangkit dari kegagalan. Seandainya hidupmu selalu berjalan mulus, kau tidak akan mengenal nikmatnya sabar. Seandainya kau tidak pernah kecewa, kau tidak akan mengenal apa yang namanya ikhlas. Dan seandainya semua keinginanmu langsung terwujud, kau tidak akan bisa merasakan indahnya berdoa. *Everything happens for a reason* (Penulis A.K.)^{***)}

^{*)} Hadits riwayat Thabrani dan Daruquthni dihasankan oleh Syeikh al Albani didalam kitab “*at Targhib wa at Tarhib*”

^{**)} Terjemahan Al-Quran surat Al-Insyirah Ayat 5.

^{***)} A.K. 2015. *Jiwa yang Lapang*. Jakarta: Gramedia.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Novia Hilma

NIM : 122210101043

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Ketoksikan Akut Kombinasi Ekstrak Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lmk.) dan Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan Parameter Histopatologi Organ Tikus Putih Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, 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 manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 18 Mei 2016
Yang menyatakan,

Novia Hilma
NIM 122210101043

SKRIPSI

**KETOKSIKAN AKUT KOMBINASI EKSTRAK DAUN JATI BELANDA
(*Guazuma ulmifolia* Lmk.) DAN KELOPAK BUNGA ROSELLA (*Hibiscus
sabdarriffa* L.) DENGAN PARAMETER HISTOPATOLOGI ORGAN
TIKUS PUTIH JANTAN GALUR WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

Oleh

Novia Hilma

NIM 122210101043

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Indah Yulia Ningsih S.Farm., Apt., M.Farm.

Dosen Pembimbing Anggota : Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Ketoksikan Akut Kombinasi Ekstrak Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lmk.) dan Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan Parameter Histopatologi Organ Tikus Putih Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*)” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Rabu, 18 Mei 2016

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota,

Indah Yulia Ningsih S.Farm., Apt., M.Farm.
NIP.198407122008122002

Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP.198107232006042002

Tim Penguji:

Penguji I,

Penguji II,

Fransiska Maria C., S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP.198404062009122008

Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt.
NIP.198304282008122004

Mengesahkan

Dekan,

Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.
NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Ketoksikan Akut Kombinasi Ekstrak Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lmk.) dan Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan Parameter Histopatologi Organ Tikus Putih Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*); Novia Hilma, 122210101043; 2016: 78 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Indonesia merupakan negara yang kaya akan flora dan fauna, banyak tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat alami salah satunya adalah daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lmk.) dan kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang digunakan sebagai obat anti hiperlipidemia. Kedua tumbuhan ini dapat menurunkan kadar kolesterol dengan mekanisme kerja yang berbeda dan ketika dikombinasikan memungkinkan terjadinya efek sinergisme dalam menurunkan kolesterol. Selain dimungkinkan terjadinya efek sinergisme dari kombinasi tersebut, tidak menutup kemungkinan terjadi peningkatan toksisitas. Oleh sebab itu, untuk menjamin keamanan penggunaannya dan sebagai dasar untuk uji aktivitas, maka perlu dilakukan uji toksisitas pada kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella menggunakan parameter histopatologi organ. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui gambaran histopatologi organ (hati, ginjal, dan jantung) tikus putih jantan galur Wistar sebagai wujud efek toksik yang timbul akibat pemejanaan kombinasi 1:1 ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella.

Uji toksisitas yang dilakukan dalam penelitian ini adalah uji toksisitas akut oral menggunakan metode OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) 423 dengan dosis awal 2000 mg/kg BB dan dilakukan pengamatan selama 14 hari. Pengamatan dilakukan dengan menimbang berat badan hewan uji pada hari pertama dan terakhir penelitian (hari ke-14). Pada hari ke-14, hewan uji dikorbankan dan organnya diambil serta ditimbang. Kemudian organ tersebut

difiksasi menggunakan *buffered neutral formalin* (BNF) 10% dan dilakukan pemeriksaan histopatologi organ. Analisis data yang digunakan untuk data berat badan dan berat organ hewan uji adalah uji-T tidak berpasangan. Sedangkan, hasil pemeriksaan histopatologi organ dianalisis secara deskriptif. Analisis data tersebut dilakukan pada hewan uji dosis tahap akhir yaitu dosis 5.000 mg/kg BB.

Hasil penelitian telah menunjukkan bahwa tidak ada kematian hewan uji pada pemejanan awal dosis 2.000 mg/kg BB, pengulangan dosis 2.000 mg/kg BB, dan pada pemejanan dosis 5.000 mg/kg BB. Sehingga, dapat diketahui bahwa nilai LD₅₀ kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella adalah lebih dari 5.000 mg/kg BB. Hasil pengamatan perubahan berat badan hewan uji menunjukkan terjadinya peningkatan berat badan yang berbeda signifikan antara kelompok kontrol normal dengan perlakuan. Selain itu, analisis berat organ hewan uji menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada berat organ ginjal hewan uji kelompok kontrol normal dan kelompok perlakuan. Berdasarkan hasil pemeriksaan histopatologi dapat diketahui bahwa kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella dalam uji toksisitas akut pada hewan uji tikus putih jantan menimbulkan perubahan histopatologi pada organ ginjal, namun tidak menimbulkan perubahan histopatologi pada organ hati dan jantung. Perubahan histopatologi organ ginjal tersebut berupa hipertrofi glomerulus, kebocoran protein, vakuolisasi dan nekrosis epitel tubulus. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella memiliki potensi nefrotoksik.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Ketoksikan Akut Kombinasi Ekstrak Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lmk.) dan Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan Parameter Histopatologi Organ Tikus Putih Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

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

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Lusia Oktora Ruma Kumala Sari, S.F., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
3. Ibu Indah Yulia N., S.Farm., Apt., M.Farm. dan Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian beliau dalam penulisan skripsi ini;
4. Ibu Fransiska Maria C., S.Farm., M.Farm., Apt. dan Ibu Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji yang banyak memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Bapak Nuri, S.Si., Apt., M.Si. selaku Dosen yang membantu dalam mengembangkan ide dalam penelitian ini;
6. Seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas bimbingan serta bantuannya selama ini;
7. Bapak Dr. drh. Bambang Sutrisno, MP., Bapak drh. Sugiyono, dan Bapak Lilik yang telah membantu dalam proses pembuatan preperat dan pemeriksaan histopatologi di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

8. Ayahanda Shonhaji, Ibunda Holifah, Saudariku Hanik Kholifah, dan keluarga tercinta yang tak henti-hentinya selalu memberikan doa dan dukungannya, menjadi sumber inspirasi bagi penulis untuk terus mengejar cita-cita dan memberikan yang terbaik;
9. Sahabat “Gejong” yang selalu memberi motivasi, semangat, keceriaan, bantuan dan dukungan yang tak pernah putus selama ini;
10. Rekan Kerja sekaligus sahabat Putu Argianti Meyta Sari dan Mahmudatus Sholihah yang telah membantu, mendampingi, dan memberikan semangat yang tak henti dari awal hingga selesainya skripsi ini;
11. Sahabat Hidayah Dwi Renggani dan Sahabat “Delapan” lainnya yang selalu memberi motivasi, semangat, bantuan dan dukungan yang tak pernah putus selama ini;
12. Keluarga Besar Petruk Rolas FF UNEJ 2012 yang telah menuliskan berbagai catatan yang tak terlupakan dalam kesejawatan ini;
13. Laboran Laboratorium Biomedik dan Fitokimia Mbak Dini, Mbak Indri, Ibu Widi, dan Mbak Anggra yang telah memberikan bimbingan dalam penelitian ini;
14. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terima kasih atas segala bantuan dan kerjasamanya.

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

Jember, Mei 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
RINGKASAN	vi
PRAKATA	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan tentang Jati Belanda	5
2.1.1 Klasifikasi Jati Belanda	5
2.1.2 Deskripsi Jati Belanda	5
2.1.3 Kandungan dan Efek Farmakologi Jati Belanda ...	6
2.2 Tinjauan tentang Rosella	7
2.2.1 Klasifikasi Rosella.....	7
2.2.2 Deskripsi Rosella.....	8
2.2.3 Kandungan dan Efek Farmakologi Rosella.....	8

2.3 Tinjauan tentang Mekanisme Kerja Daun Jati Belanda dan Kelopak Bunga Rosella sebagai Obat Herbal Antihiperlipidemia.....	9
2.4 Tinjauan tentang Toksisitas Daun Jati Belanda dan Kelopak Bunga Rosella	11
2.5 Tinjauan tentang Toksikologi	13
2.5.1 Definisi Toksikologi.....	13
2.5.2 Asas Umum Toksikologi.....	13
2.5.3 Uji Toksikologi.....	19
2.5.4 Uji Ketoksikan Akut.....	19
2.5.5 Uji Ketoksikan Akut Oral Metode 423	20
2.5.6 Histopatologi Organ	23
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	33
3.1 Jenis Penelitian.....	33
3.2 Rancangan Penelitian	33
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian.....	34
3.4 Alat dan Bahan.....	34
3.4.1 Subyek Uji	34
3.4.2 Alat	35
3.4.3 Bahan.....	35
3.5 Variabel Penelitian	35
3.5.1 Variabel Bebas	35
3.5.2 Variabel Terikat	35
3.5.3 Variabel Terkendali.....	35
3.6 Definisi Operasional	36
3.7 Prosedur Penelitian.....	36
3.7.1 Ekstraksi Daun Jati Belanda	36
3.7.2 Ekstraksi Kelopak Bunga Rosella.....	36
3.7.3 Uji Toksisitas Akut	37
3.7.4 Pengamatan	42
3.7.5 Histopatologi Organ.....	42

3.8 Analisis Data.....	43
3.9 Skema Alur Penelitian.....	44
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	45
4.1 Ekstraksi Daun Jati Belanda dan Kelopak Bunga Rosella	45
4.2 Uji Ketoksikan Akut dengan Metode OECD 423	45
4.3 Pengamatan Perubahan Berat Badan Hewan Uji	46
4.4 Pengukuran Berat Organ (Hati, Ginjal, dan Jantung) Hewan Uji.....	47
4.5 Histopatologi Organ Hewan Uji	49
BAB 5. PENUTUP.....	55
5.1 Kesimpulan.....	55
5.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN.....	62

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Klasifikasi LD ₅₀ pada <i>Globally Harmonized Classification System</i> (GHS)	22
4.1 Hasil ekstraksi daun jati belanda dan kelopak bunga rosella	45
4.2 Data berat badan hewan uji kelompok kontrol normal dan kelompok perlakuan	46
4.3 Hasil pemeriksaan histopatologi organ hati, ginjal, dan jantung hewan uji.....	53

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Daun jati belanda	6
2.2 Tanaman rosella	8
2.3 Mekanisme kerja flavonoid dalam menghambat HMG CoA Reduktase	10
2.4 Mekanisme kerja kelopak bunga rosella sebagai inhibitor <i>prancreatic lipase</i>	11
2.5 Histologi hati normal	25
2.6 Histopatologi hati	27
2.7 Histologi ginjal normal	28
2.8 Histopatologi ginjal	29
2.9 Histologi jantung normal	30
2.10 Histopatologi jantung	32
3.1 Skema rancangan penelitian	33
3.2 Skema alur pengujian ketoksikan akut oral metode OECD 423 dengan dosis awal 2.000 mg/kg BB	41
3.3 Skema alur penelitian	44
4.1 Histogram berat organ hati, ginjal, dan jantung hewan uji	48
4.2 Gambaran histopatologi organ hati hewan uji	49
4.3 Gambaran histopatologi organ ginjal hewan uji	51
4.4 Gambaran histopatologi organ jantung hewan uji	53

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Surat Keterangan Identifikasi Tumbuhan	62
A.1 Surat Keterangan Identifikasi Jati Belanda	62
A.2 Surat Keterangan Identifikasi Rosella	63
B. Hasil Rendemen Ekstrak	64
B.1 Ekstrak Etanol Daun Jati Belanda	64
B.2 Ekstrak Air Kelopak Bunga Rosella	64
C. Perhitungan Dosis Uji Ketoksikan Akut.....	65
C.1 Dosis 2.000 mg/kg BB Replikasi 1	65
C.2 Dosis 2.000 mg/kg BB Replikasi 2	66
C.3 Dosis 5.000 mg/kg BB	67
D. Perhitungan Purata Perubahan Berat Badan Per Hari	
Hewan uji	70
D.1 Purata Perubahan Berat Badan Per Hari Kelompok Kontrol Normal..	70
D.2 Purata Perubahan Berat Badan Per Hari Kelompok Perlakuan	70
E. Hasil Pemeriksaan Histopatologi Organ Hewan Uji	71
F. Analisis Data Uji Normalitas	74
F.1 Data Purata Perubahan Berat Badan Per Hari Hewan uji	74
F.2 Data Berat Organ Hati Hewan Uji	74
F.3 Data Berat Organ Ginjal Hewan Uji	74
F.4 Data Berat Organ Jantung Hewan Uji.....	74
G. Analisis Data Uji Homogenitas dan Uji-T Tidak Berpasangan.....	75
G.1 Data Purata Perubahan Berat Badan Per Hari Hewan uji	75
G.2 Data Berat Organ Hati Hewan Uji	76
G.3 Data Berat Organ Ginjal Hewan Uji	77
G.4 Data Berat Organ Jantung Hewan Uji.....	78

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang kaya akan flora dan fauna. Banyak tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat alami. Masyarakat Indonesia telah lama mengenal dan menggunakan obat herbal sebagai salah satu upaya dalam menanggulangi masalah kesehatan (Sari, 2006), karena obat herbal dinilai relatif aman untuk mengobati penyakit. Saat ini, obat herbal banyak dimanfaatkan untuk mengatasi berbagai penyakit kronis dan penyakit degeneratif (WHO, 2003), salah satunya adalah penyakit hiperlipidemia.

Hiperlipidemia atau sering disebut hiperkolesterolemia adalah kenaikan kadar lipid dan kolesterol di dalam darah. Hiperkolesterolemia merupakan faktor risiko utama untuk penyakit kardiovaskular dan dapat menyebabkan aterosklerosis (Dipiro *et al.*, 2008). Aterosklerosis merupakan penyakit yang mengenai intima arteri elastik. Penyakit ini ditandai oleh pengendapan intramural lemak, proliferasi sel otot polos vaskular dan fibroblas, penumpukan makrofag, serta menimbulkan penebalan dan kekakuan pada arteri. Aterosklerosis dapat menyebabkan penyakit kardiovaskular khususnya penyakit jantung koroner (Damjanov, 2000). Saat ini, penyakit kardiovaskular merupakan penyebab kematian utama di berbagai negara maju, dan terlihat ada kecenderungan peningkatan di negara berkembang (Hatma, 2011). Pada tahun 2008 diperkirakan sebanyak 17,3 juta kematian di dunia disebabkan oleh penyakit kardiovaskuler dan diperkirakan akan terus meningkat mencapai 23,3 juta kematian pada tahun 2030 (Kemenkes RI, 2014).

Di Indonesia, prevalensi hiperkolesterolemia terus meningkat. Dalam kurun waktu 1988 dan 1993 survei MONICA (*Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease*) menunjukkan bahwa prevalensi hiperkolesterolemia telah meningkat dari 13,6% menjadi 16,5% pada laki-laki dan 16% menjadi 17% pada perempuan. Hiperkolesterolemia merupakan faktor risiko kematian di usia muda. Menurut Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2004, prevalensi hiperkolesterolemia di Indonesia pada usia 25 hingga 34 tahun

sebesar 9,3%, sementara pada usia 55 hingga 64 tahun sekitar 15,5%. Berdasarkan laporan Badan Kesehatan Dunia (WHO) pada tahun 2002, tercatat sebanyak 4,4 juta kematian akibat hiperkolesterolemia atau sebesar 7,9% dari jumlah total kematian di usia muda. Hal ini menunjukkan bahwa hiperkolesterolemia merupakan ancaman serius dalam kesehatan global (Wignjosoesastro *et al.*, 2014).

Di Indonesia, daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lmk.) dan kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) telah digunakan secara tradisional untuk menurunkan kolesterol. Hasil penelitian Sari *et al.* (2013) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jati belanda dengan dosis 59,6 mg/kg BB mampu menurunkan kolesterol pada tikus putih jantan sebanding dengan orlistat yang merupakan kontrol positif penelitian. Sedangkan penelitian *in vitro* menunjukkan ekstrak air kelopak bunga rosella dengan dosis 45 mg/kg BB memiliki aktivitas antilipase paling baik dibandingkan dengan herbal penurun kolesterol lain yakni *Guazuma ulmifolia* Lmk., *Gynura procumbens* (Lour.) Merr., dan *Murraya paniculata*. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Sukandar *et al.* (2009) menunjukkan bahwa ekstrak daun jati belanda dengan dosis 50 mg/kg BB mampu menghambat peningkatan kadar kolesterol total dan LDL dibandingkan dengan kontrol positif simvastatin dosis 0,72 mg/kg BB pada tikus putih jantan, dan penelitian yang dilakukan oleh Lin *et al.* (2007) menunjukkan bahwa ekstrak air kelopak bunga rosella dalam sediaan kapsul berisi 500 mg ekstrak dapat menurunkan kadar kolesterol pada perempuan dan laki-laki.

Aktivitas antihiperlipidemia dari daun jati belanda dan kelopak bunga rosella disebabkan oleh adanya kandungan senyawa flavonoid dan senyawa fenolik. Daun jati belanda memiliki kandungan flavonoid yaitu katekin, kamferol, prosianidin, dan tilirosida (Kumar, 2013). Sedangkan, kelopak bunga rosella mengandung beberapa senyawa fenolik sederhana dan beberapa senyawa flavonoid yaitu antosianin, antosianidin dan glikosida kuersetin (Zarrabal *et al.*, 2012). Kandungan antosianin pada kelopak bunga rosella diketahui paling bertanggung jawab terhadap aktivitas antihiperlipidemia (Hopkins *et al.*, 2013). Mekanisme aksi dari jati belanda untuk menurunkan kolesterol adalah dengan

menghambat enzim HMG CoA reduktase yang berperan dalam proses pembentukan kolesterol pada sintesis *de novo* (Havsteen, 2002). Sedangkan rosella diketahui memiliki aktivitas sebagai inhibitor *pancreatic lipase* yaitu menurunkan penyerapan dan pencernaan lipid makanan (Sari *et al.*, 2013). Berdasarkan hal tersebut, ketika jati belanda dan rosella dikombinasikan, maka diharapkan dapat memiliki efek yang lebih baik dengan bekerja secara sinergisme untuk menurunkan kolesterol.

Selain dimungkinkan terjadinya efek sinergisme dari kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella, tidak menutup kemungkinan terjadi peningkatan toksisitas dari penggunaan kombinasi tersebut. Oleh sebab itu, untuk menjamin keamanan penggunaannya dan sebagai dasar untuk uji aktivitas, maka perlu dilakukan uji toksisitas pada kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella dengan perbandingan berat ekstrak yang digunakan adalah 1:1.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ketoksikan akut kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dengan ekstrak air kelopak bunga rosella pada tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*). Metode yang digunakan adalah OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) 423 yaitu suatu metode untuk pengujian toksisitas akut oral yang merupakan alternatif dari metode OECD 401. Prinsip dari metode ini adalah hewan uji yang digunakan lebih sedikit (3 hewan uji dengan jenis kelamin yang sama pada tiap tahap uji) dan menggunakan kematian hewan uji sebagai *end point* (OECD, 2001b). Pengamatan efek toksik yang timbul dilakukan dengan melihat histopatologi organ tikus putih jantan galur Wistar, sehingga diharapkan dapat diketahui keamanan penggunaan kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana gambaran histopatologi organ (hati, ginjal, dan jantung) tikus putih jantan galur Wistar sebagai wujud efek toksik yang timbul akibat pemejanaan kombinasi 1:1 ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella.

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui gambaran histopatologi organ (hati, ginjal, dan jantung) tikus putih jantan galur Wistar sebagai wujud efek toksik yang timbul akibat pemejanan kombinasi 1:1 ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat kepada berbagai pihak, antara lain:

1. Memberikan informasi tentang potensi ketoksikan akut penggunaan tanaman sebagai obat tradisional, khususnya kombinasi daun jati belanda dan kelopak bunga rosella.
2. Sebagai dasar informasi pengembangan obat herbal terstandar di Indonesia.
3. Sebagai data awal untuk penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Jati Belanda

2.1.1. Klasifikasi Jati Belanda

Jati belanda termasuk dalam familia Sterculiaceae adalah tanaman asli negara-negara Amerika Latin. Jati belanda memiliki beberapa nama daerah antara lain jati belanda (Melayu) dan jati londo (Jawa). Sementara itu, nama-nama asingnya adalah *west indian elm*, *bastard cedar* (Inggris), *orme d’Amerique* (Prancis), dan *guasima* (Meksiko) (Suharmiyati dan Maryani, 2003). Tanaman ini memiliki klasifikasi sebagai berikut (Backer dan Brink, 1965):

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Superdivisi	: Embriophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Subdivisi	: Spermathopytina
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Dilleniidae
Ordo	: Malvales
Familia	: Sterculiaceae
Genus	: <i>Guazuma</i>
Species	: <i>Guazuma ulmifolia</i> Lmk.

2.1.2 Deskripsi Jati Belanda

Jati belanda merupakan tumbuhan yang berasal dari Amerika. Morfologi tumbuhan ini berupa semak atau pohon dengan tinggi 10-20 meter, dan memiliki percabangan yang ramping. Bentuk daunnya bundar telur sampai lanset, panjang helai daun 4 cm sampai 22,5 cm, lebar 2-10 cm, pangkalnya menyerong berbentuk jantung, dengan bagian ujung yang tajam, permukaan daun bagian atas berambut jarang, permukaan bagian bawah berambut rapat, panjang tangkai daun

5-25 mm, mempunyai daun penumpu berbentuk lanset atau berbentuk paku, panjang 3-6 cm. Gambar daun jati belanda dapat dilihat pada Gambar 2.1. Perbungaan berupa mayang, panjang 2-4 cm, berbunga banyak, bentuk bunga agak ramping dan berbau wangi, panjang gagang bunga kurang lebih 5 mm, kelopak bunga lebih kurang 3 mm, mahkota bunga berwarna kuning, panjang 3-4 mm, tajuk terbagi dalam 2 bagian, berwarna ungu tua kadang-kadang kuning tua, panjang 3-4 mm, bagian bawah terbentuk garis panjang 2-2,5 mm, tabung benang sari berbentuk 5 mangkuk, bakal buah berambut, dan panjang buah 2-3,5 cm. Buah yang telah masak berwarna hitam (Depkes RI, 1979).



Gambar 2.1 Daun jati belanda (Sumber: pitchandikulam-herbarium.org)

2.1.3 Kandungan dan Efek Farmakologi Jati Belanda

Zat utama yang terkandung dalam seluruh bagian tanaman jati belanda adalah tanin dan lendir atau musilago (Suharmiyati dan Maryani, 2003). Daun jati belanda mengandung oktakosanol, taraxerol-oac, friedelin-3- α -oac, α -sitosterol, dan friedelinol-3-asetat, kulit batangnya mengandung kamferol dan buahnya mengandung musilago yang manis (Jalpa *et al.*, 2012). Daun jati belanda mengandung senyawa golongan flavonoid, yakni katekin, kamferol, prosianidin, epikatekin, dan flavonokumarin (Maldini *et al.*, 2013). Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa pada ekstrak daun jati belanda terdeteksi flavonoid dan tanin yang kadarnya tinggi (Iswantini *et al.*, 2011).

Di Indonesia, daun jati belanda telah digunakan secara tradisional untuk menurunkan berat badan (obesitas) dan mengurangi kadar lemak yang berlebihan

(hiperkolesterolemia). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Sukandar *et al.* (2009) menunjukkan bahwa ekstrak air daun jati belanda pada dosis 50 mg/kg berat badan dapat menurunkan kolesterol total dan LDL secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Demikian juga kombinasi ekstrak air daun jati belanda dosis 25 mg/kg berat badan dengan ekstrak etanol rimpang kunyit dosis 12,5 mg/kg berat badan dapat menurunkan kadar kolesterol total dan LDL secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol (Sukandar *et al.*, 2012). Daun jati belanda juga menunjukkan efek hepatoprotektif pada liver tikus albino yang diinduksi CCl₄ (Sharma *et al.*, 2013). Ekstrak etanol daun jati belanda konsentrasi 60 mg/L dapat menghambat aktivitas enzim lipase sebesar 25,13% *in vitro*. Hasil tersebut lebih tinggi dibandingkan orlistat konsentrasi 100 mg/L yang menghambat aktivitas enzim lipase sebesar 17,53% (Iswantini *et al.*, 2011).

2.2 Tinjauan tentang Rosella

2.2.1 Klasifikasi Rosella

Rosella memiliki beberapa nama daerah antara lain asam susur (Melayu), asam jarot (Sunda), dan kasturi roriha (Ternate) (Wijayakusuma, 2008). Dalam taksonomi tumbuhan, rosella diklasifikasikan sebagai berikut (Backer dan Brink, 1965):

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Superdivisi	: Embriophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Subdivisi	: Spermathophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Dilleniidae
Ordo	: Malvales
Familia	: Malvaceae
Genus	: <i>Hibiscus</i>
Species	: <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.

Gambar tanaman rosella dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Tanaman rosella (Sumber: naturalplanttherapy.com)

2.2.2 Deskripsi Rosella

Rosella merupakan tumbuhan semak umur satu tahun, tinggi tumbuhan mencapai 2,4 m. Batang berwarna merah, berbentuk bulat dan berbulu. Daun rosella berseling 3-5 helai dengan panjang 7,5-12,5 cm berwarna hijau dan tangkai daunnya pendek. Daun di bagian cabang dan ujung batang berbagi menjadi tiga toreh, lebar toreh daun 2,5 cm, tepi daun beringgit, pangkal daun meruncing, sedikit berambut. Bunga rosella berupa bunga tunggal, kuncup bunga tumbuh dari bagian ketiak daun, tangkai bunga berukuran 5-20 mm, kelopak bunga berlekatan, dan berbentuk lonceng. Mahkota bunga rosella berwarna merah sampai kuning dengan warna lebih gelap dibagian tengahnya. Tangkai sari merupakan tempat melekatnya kumpulan benang sari berukuran pendek dan tebal. Putik berbentuk tabung dan berwarna kuning atau merah. Bunga rosella bersifat hermiprodit sehingga mampu menyerbukan sendiri (Backer dan Brink, 1965).

2.2.3 Kandungan dan Efek Farmakologi Rosella

Rosella memiliki kandungan senyawa seperti antosianin, gossyptin, glukosida, hibiscin, vitamin A, vitamin C, asam amino, asam organik, dan polisakarida (Wijayakusuma, 2008). Sedangkan, kelopak bunga rosella mengandung beberapa senyawa fenol sederhana dan beberapa senyawa flavonoid (antosianin, antosianidin dan glikosida kuersetin), asam organik dan derivatnya,

vitamin C (asam askorbat), B₁ (tiamin), dan B₂ (riboflavin), dan karotenoid (karoten) (Zarrabal *et al.*, 2012).

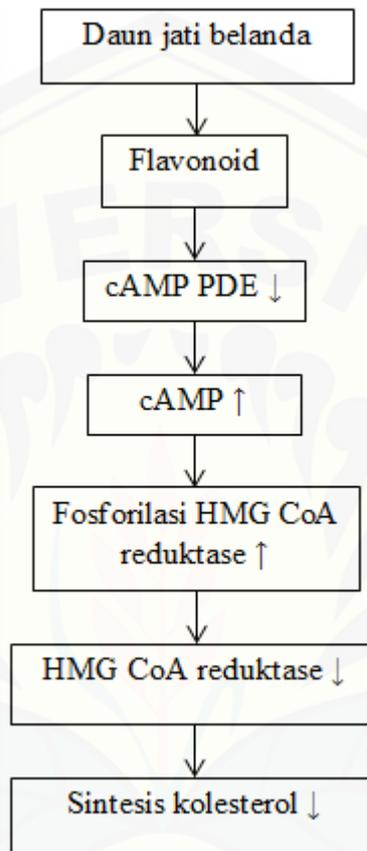
Rosella diketahui memiliki beberapa efek farmakologi seperti antioksidan, antibakteri, antiradang, antihelminik, dan anti hipotensif. Efek lain dari rosella diketahui memiliki kegunaan menurunkan kolesterol tinggi, mengatasi hipertensi, mencegah gangguan jantung, mencegah kanker, sariawan dan sembelit (Wijayakusuma, 2008).

Kelopak bunga rosela secara tradisional telah digunakan untuk menurunkan kolesterol (Sari *et al.*, 2013). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Aguilar *et al.* (2007) menunjukkan bahwa ekstrak air terstandar bunga rosella yang mengandung antosianin total 33,64 mg per 120 mg ekstrak dapat menurunkan berat badan mencit kegemukan secara signifikan. Ekstrak kelopak bunga rosella kemungkinan memiliki mekanisme aksi sebagai antihiperlipidemia dengan hambatan terhadap lipase pankreas, hambatan akumulasi lemak pada sel lemak, atau hambatan pada enzim *fatty acid synthase* (Zarrabal *et al.*, 2012). Hasil penelitian Sari *et al.* (2013) menunjukkan bahwa ekstrak air kelopak bunga rosela memiliki aktivitas antilipase paling baik diantara beberapa herbal antikolesterol Indonesia.

2.3 Tinjauan tentang Mekanisme Kerja Daun Jati Belanda dan Kelopak Bunga Rosella sebagai Obat Herbal Antihiperlipidemia

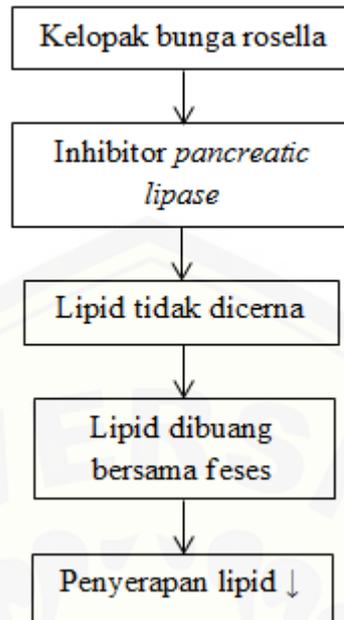
Daun jati belanda dan kelopak bunga rosella telah banyak dimanfaatkan sebagai obat penurun kolesterol. Daun jati belanda memiliki kandungan flavonoid yang mampu menghambat HMG CoA reduktase (*3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase*). HMG CoA reduktase merupakan enzim kunci dalam sintesis *de novo* kolesterol. Aktivitas HMG CoA reduktase diregulasi melalui reaksi fosforilasi dan defosforilasi. Fosforilasi HMG CoA reduktase oleh cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) menyebabkan enzim tidak aktif. Koenzim cAMP dipecah oleh cAMP PDE (*cAMP phosphodiesterase*) yang dapat dihambat oleh flavonoid. Penghambatan pada cAMP PDE menyebabkan konsentrasi cAMP meningkat, fosforilasi HMG CoA reduktase meningkat, HMG CoA reduktase

aktivitasnya menurun dan sintesis kolesterol menurun. Daun jati belanda akan menghambat HMG CoA reduktase yang dimediasi penghambatan pada cAMP PDE (Havsteen, 2002). Mekanisme kerja flavonoid dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Mekanisme kerja flavonoid dalam menghambat HMG CoA reduktase

Sedangkan kelopak bunga rosella memiliki kandungan antosianin yang diketahui paling bertanggung jawab terhadap aktivitas antihiperlipidemia (Hopkins *et al.*, 2013). Kelopak bunga rosella diketahui memiliki aktivitas sebagai inhibitor *pancreatic lipase* yaitu menurunkan penyerapan dan pencernaan lipid makanan (Sari *et al.*, 2013). Penghambatan terhadap *pancreatic lipase* menyebabkan lipid tidak dipecah menjadi asam lemak dan gliserol sehingga tidak terjadi penyerapan lipid di usus halus. Lipid tersebut akan dikeluarkan bersama feses melalui anus (Toruan, 2007). Mekanisme kerja kelopak bunga rosella dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Mekanisme kerja kelopak bunga rosella sebagai inhibitor *pancreatic lipase*

Berdasarkan perbedaan mekanisme kerja tersebut, penggunaan kombinasi daun jati belanda dan rosella diharapkan mampu bekerja secara sinergisme. Ketika terjadi hiperlipidemia atau terdapat lipid yang masuk ke dalam tubuh, lipid tersebut akan dihambat pemecahan atau pencernaannya oleh kelopak bunga rosella melalui aktivitas inhibitor *pancreatic lipase*. Selain itu, terjadi penghambatan pembentukan kolesterol oleh daun jati belanda melalui penghambatan pada enzim HMG CoA reduktase. Namun, penggunaan kombinasi obat herbal perlu diwaspadai karena dapat terjadi interaksi yang dapat menyebabkan peningkatan toksisitas. Sehingga perlu dilakukan uji toksisitas terhadap penggunaan kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella untuk menjamin keamanan penggunaannya dan sebagai dasar untuk uji aktivitas.

2.4 Tinjauan tentang Toksisitas Daun Jati belanda dan Kelopak Bunga Rosella

Daun jati belanda dan kelopak bunga rosella telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat dari berbagai penyakit. Daun jati belanda telah

lazim dipakai sebagai bahan ramuan pelangsing berat badan. Berdasarkan uji ketoksikan akut ekstrak etanol daun jati belanda yang dilakukan oleh Utomo dan Wijayahadi (2008) dapat diketahui bahwa ekstrak etanol daun jati belanda memiliki nilai LD₅₀ sebesar 6.324,14 mg/kgBB. Hasil tersebut mempunyai makna toksikologi bahwa potensi ketoksikan akut ekstrak etanol daun jati belanda termasuk dalam kategori praktis tidak toksik. Sedangkan berdasarkan penelitian Rozqie *et al.* (2012) menunjukkan bahwa rebusan daun jati belanda dengan pemejanaan 3 mL dari konsentrasi 0,53 g/100 mL, 1,06 g/100 mL, dan 2,12 g/100 mL dengan dosis sekali pemberian selama 7 hari menyebabkan terjadinya perubahan gambaran histopatologis ginjal tikus putih. Perubahan tersebut meliputi peningkatan proliferasi sel mesangial, kongesti pada pembuluh darah ginjal, infiltrasi sel inflamasi dan nekrosis jaringan.

Penelitian toksisitas rosella telah dilakukan dari toksisitas akut, subkronik, dan kronik. Berdasarkan penelitian Onyenekwe *et al.* (1999) diketahui nilai LD₅₀ dari infusa kelopak bunga rosella adalah lebih dari 5.000 mg/kg BB. Penelitian Prommetta *et al.* (2006) menunjukkan bahwa ekstrak air kelopak bunga rosella dengan dosis 250 mg/kg BB dan 1.000 mg/kg BB selama 30 hari tidak menyebabkan perubahan signifikan pada aktivitas enzim *Alanine aminotransferase* (ALT) dan *aspartate aminotransferase* (AST). Sedangkan ekstrak air kelopak bunga rosella dengan dosis 1.000-5.000 mg/kg BB selama 28 hari menunjukkan efek nefrotoksik yaitu terjadi penurunan natrium dan kalium serum serta peningkatan pada kadar serum kreatinin pada tikus putih jantan (Abu Bakar *et al.*, 2010). Berdasarkan penelitian Fakeye *et al.* (2008) menunjukkan bahwa konsumsi kronik 90 hari ekstrak air dan etanol kelopak bunga rosella tidak menyebabkan perubahan histologi pada organ hati dan jantung hewan uji, namun menunjukkan terjadinya pengecilan pada korpuskular ginjal dan terjadi penurunan berat organ limfa yang signifikan. Berdasarkan pemeriksaan histopatologi, konsumsi kronik ekstrak air kelopak bunga rosella dengan dosis 200 mg/kg, 500 mg/kg, dan 800 mg/kg BB menyebabkan terjadinya kongesti pembuluh darah, interstitial pendarahan fokal, pendarahan glomerulus, dan peningkatan serum urea dan kreatinin yang dapat mengganggu fungsi ginjal normal. Pemeriksaan tersebut

menunjukkan bahwa ekstrak air kelopak bunga rosella menyebabkan distorsi ringan pada jaringan organ ginjal (Ukoha *et al.*, 2015).

2.5 Tinjauan tentang Toksikologi

2.5.1 Definisi Toksikologi

Toksikologi ialah ilmu pengetahuan mengenai kerja senyawa kimia yang merugikan terhadap organisme hidup. Dengan demikian, toksikologi adalah cabang dari ilmu farmakologi. Toksikologi didefinisikan sebagai ilmu pengetahuan tentang interaksi antara senyawa kimia dengan organisme hidup (Ariens *et al.*, 1994). Toksikologi adalah ilmu tentang aksi berbahaya suatu senyawa kimia atas suatu sistem biologis (Donatus, 2001). Dan menurut Lu (1995), toksikologi didefinisikan sebagai kajian tentang hakikat dan mekanisme efek toksik berbagai bahan terhadap makhluk hidup dan sistem biologik lainnya.

Toksikologi merupakan cabang ilmu pengetahuan yang berkaitan dengan racun. Racun sendiri didefinisikan sebagai suatu zat yang dapat menimbulkan efek berbahaya bagi organisme hidup apabila terpejani, baik secara sengaja atau tidak sengaja. Hal ini berarti bahwa dalam toksikologi mempelajari interaksi suatu senyawa kimia atau senyawa asing dengan suatu sistem biologi atau makhluk hidup (Donatus, 2001).

Toksikologi dapat digolongkan menjadi efek toksik akut dan efek toksik kronis. Efek toksik akut memiliki korelasi langsung dengan absorpsi zat toksik. Sedangkan efek toksik kronis, yang biasanya zat toksik berada dalam jumlah kecil, diabsorpsi sepanjang waktu yang lama, dan terakumulasi mencapai konsentrasi toksik sehingga menimbulkan gejala keracunan. Selain itu juga terdapat toksisitas jangka waktu panjang yang diartikan sebagai efek toksik yang baru muncul setelah periode waktu laten yang lama, misalnya bersifat karsinogenik dan mutagenik (Ariens *et al.*, 1994).

2.5.2 Asas Umum Toksikologi

Toksikologi dikembangkan dengan tujuan utama untuk mengantisipasi pengaruh toksik, pencegahan aksi toksik, dan penyembuhan keracunan yang mungkin terjadi karena pemejanaan suatu senyawa atas makhluk hidup (Lu, 1995),

sehingga diperlukan pemahaman mengenai asas umum toksikologi. Asas umum toksikologi merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi timbulnya efek toksik (Priyanto, 2010). Berdasarkan alur peristiwa timbulnya efek toksik, terdapat empat asas umum yang perlu dipelajari dan dipahami dalam toksikologi, yaitu kondisi pemejanan, kondisi makhluk hidup, mekanisme aksi, wujud dan sifat efek toksik atau pengaruh berbahaya racun (Donatus, 2001).

a. Kondisi Pemejanan

Kondisi pemejanan adalah semua faktor yang menentukan keberadaan racun di tempat aksi tertentu didalam tubuh, yang berkaitan dengan pemejanannya pada makhluk hidup. Hal-hal yang termasuk dalam kondisi pemejanan adalah sebagai berikut:

1) Jenis Pemejanan

Terdapat dua jenis pemejanan yaitu akut dan kronis. Pemejanan akut merupakan peristiwa tunggal masuknya sejumlah racun kedalam tubuh. Sedangkan pemejanan kronis berlaku bagi peristiwa keracunan yang terjadi setelah beberapa hari, minggu, bulan, atau tahun pemejanan berulang dengan racun (Donatus, 2001).

2) Jalur Pemejanan

Berkaitan dengan ketoksikan racun, jalur pemejanan sangat besar artinya dalam menentukan ketersediaan senyawa induk atau metabolitnya di suatu tempat aksi yang berkaitan dengan keefektifan absorpsi racun tersebut. Semakin efektif absorpsi racun maka, semakin cepat dan besar kadar racun yang berada di sirkulasi sistemik yang tersedia untuk didistribusikan ke tempat aksi yang akan menentukan ketoksikan racun tersebut (Donatus, 2001). Jalur utama bagi penyerapan toksikan adalah saluran cerna, paru-paru, dan kulit. Namun dalam penelitian toksikologi sering digunakan jalur khusus seperti injeksi intraperitoneal, intramuskular, dan subkutan (Lu, 1995).

3) Lama dan Kecepatan Pemejanan

Lama pemejanan racun ialah batas kurun waktu pemejanan sesuatu terhadap makhluk hidup. Sedangkan kecepatan pemejanan adalah batas pemejanan racun terhadap makhluk hidup setiap satuan waktu, dengan takaran

atau dosis serta jalur pemejanaan tertentu. Lama dan kekerapan pemejanaan racun dapat mempengaruhi wujud dan ketoksikan racun tertentu. Pencapaian Kadar Toksik Minimum (KTM) suatu racun akan cepat terjadi apabila racun tersebut dipejankan secara akut dengan dosis yang benar. Pada pemejanaan racun dengan dosis kecil yang berulang-ulang (dosis terbagi), KTM dapat dicapai dengan lebih sulit atau lebih lama. Keadaan ini terjadi bila eliminasi (metabolisme dan ekskresi) berlangsung lebih cepat daripada absorpsi racun tersebut (Donatus, 2001). Efek toksik akibat pemejanaan yang kronis terjadi apabila racun menumpuk di dalam tubuh yaitu ketika kecepatan absorpsi melebihi kecepatan eliminasinya (Ariens *et al.*, 1994).

4) Saat dan Takaran Pemejanaan

Saat dilakukannya pemejanaan merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi respon makhluk hidup terhadap ketoksikan suatu zat toksik. Selain itu, takaran pemejanaan juga mempengaruhi hal tersebut, dimana semakin besar takaran pemejannya semakin besar pula kadar yang ada di tempat aksi, sehingga harga KTM akan cepat terlampaui (Donatus, 2001). Intensitas efek suatu bahan kimia bergantung pada kadarnya di tempat kerja, yaitu dari dosis efektifnya (Lu, 1995).

b. Kondisi Makhluk Hidup

Kondisi makhluk hidup adalah keadaan fisiologi serta patologi makhluk hidup, yang dapat mempengaruhi ketersediaan racun di sel sasaran dan keefektifan antaraksi racun. Kondisi makhluk hidup dibagi menjadi dua yaitu kondisi normal (kondisi fisiologi) dan kondisi tidak normal (kondisi patologi) (Donatus, 2001). Beberapa kondisi fisiologi yang mempengaruhi keefektifan antaraksi racun adalah jenis kelamin, berat badan, umur, suhu tubuh, kecepatan pengosongan lambung, kecepatan aliran darah, status gizi, kehamilan, dan genetika (Lu, 1995).

Ketersediaan racun di tempat aksi tertentu di dalam tubuh, ditentukan oleh keefektifan absorpsi, distribusi, dan eliminasi racun. Adanya penyakit dapat mempengaruhi kapasitas ketiga proses translokasi racun atau zat toksik dalam tubuh yang akan mempengaruhi ketersediaan zat toksik di tempat aksi. Beberapa

keadaan patologi yang penting adalah penyakit saluran cerna, kardiovaskular, hati, dan ginjal (Donatus, 2001).

c. Mekanisme Aksi Toksik

Penyebab dari timbulnya keracunan yang terlihat dari wujud dan sifat efek toksik yang muncul dapat diketahui dengan mempelajari mekanisme aksi dari senyawa toksik. Terdapat tiga mekanisme efek toksik, yaitu mekanisme berdasarkan sifat dan tempat kejadian (fenomena patologi), interaksi racun dan tempat aksinya, serta resiko penumpukan racun di dalam gudang penyimpanan tubuh (Donatus, 2001).

Mekanisme aksi berdasarkan sifat dan tempat kejadian dibagi menjadi dua yaitu mekanisme luka intrasel dan mekanisme luka ekstrasel. Mekanisme luka intrasel adalah luka sel yang diawali oleh aksi racun pada tempat aksinya di dalam sel, mekanisme ini sering disebut sebagai mekanisme langsung atau primer. Sedangkan mekanisme luka ekstrasel terjadi secara tidak langsung yakni racun bekerja di luar lingkungan sel, sehingga disebut sebagai mekanisme tidak langsung atau sekunder (Donatus, 2001). Mekanisme luka ekstrasel diakibatkan senyawa racun baik dalam bentuk induk maupun metabolitnya yang mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi sel (Priyanto, 2010).

Semua efek toksik terjadi karena interaksi biokimiawi antara toksikan dan atau metabolitnya dengan struktur reseptor tertentu di dalam tubuh (Lu, 1995). Mekanisme aksi berdasarkan sifat antaraksi melibatkan tempat sasaran molekuler yang disidik sebagai gugus kimia fungsi SH atau NH_2 dari biopolimer (gugus tempat alkilasi), tempat aksi selektif, dan kompartemen tertentu dimana penumpukan zat kimia mungkin terjadi. Mekanisme aksi molekuler ini digolongkan menjadi dua yaitu aksi toksik yang didasarkan atas antaraksi yang terbalikkan dan yang tak terbalikkan antara racun dan tempat aksinya. Antaraksi yang terbalikkan memiliki ciri khas dapat terbalikkan artinya apabila kadar racun yang ada pada reseptor habis, maka reseptor akan kembali pada konformasi semula dan efek toksik yang timbul dapat segera normal. Sedangkan antaraksi yang tak terbalikkan terjadi dengan terbentuknya ikatan kovalen antara senyawa pengalkil atau metabolit elektrofil dan biopolimer yang memiliki gugus SH atau

NH_2 menghasilkan luka kimia yang berlanjut menjadi efek toksik. Antaraksi tak terbalikkan ini memungkinkan terjadinya penumpukan efek yang karena sifat kerusakannya menetap maka pemejanan dengan takaran yang sangat kecil dalam jangka waktu panjang akan menimbulkan efek toksik yang selektif dengan yang ditimbulkan oleh pemejanan racun dalam jumlah besar dengan jangka waktu pendek (Donatus, 2001).

Mekanisme aksi berdasarkan risiko penumpukan dapat terjadi terutama pada senyawa lemak yang bersifat sangat lipofil dan sulit dimetabolisme yang cenderung akan disimpan didalam gudang penyimpanan kompartemen lemak yang dikenal sebagai sekuestrasi fisik. Hal ini relatif tidak membahayakan karena senyawa tersebut tidak bersifat aktif didalam gudang penyimpanan, namun secara perlahan senyawa tersebut dapat lepas dan tersebar disirkulasi tubuh sehingga apabila kadarnya melebihi KTM maka akan timbul efek toksik yang tidak diinginkan (Donatus, 2001).

d. Wujud dan Sifat Efek Toksik

Wujud dan sifat efek toksik suatu racun pada dasarnya merupakan hasil akhir sederetan proses biologi yang diawali oleh aksi racun pangan atau tempat aksi tertentu, kemudian diikuti oleh berbagai respon sel atau jaringan terhadap luka kimia akibat antaraksi sebelumnya, dan berbagai perubahan patologi sesuai dengan jenis respon yang terjadi (Donatus, 2001). Wujud efek toksik ini ada yang bersifat terbalikkan dan ada yang bersifat tak terbalikkan (Lu, 1995).

Efek toksik biokimiawi adalah efek toksik yang tidak menyebabkan perubahan morfologis (Lu, 1995). Wujud efek toksik biokimiawi merupakan wujud efek toksik yang terbalikkan, yaitu terjadinya perubahan biokimia terhadap luka sel akibat interaksi antara senyawa racun dengan tempat aksinya. Misalnya penghambatan respirasi seluler, perubahan keseimbangan cairan dan elektrolit serta gangguan pasokan energi (Donatus, 2001; Priyanto, 2009). Selain itu, wujud efek toksik fisiologis berkaitan erat dengan fungsi jasmani seperti bernafas, peredaran darah, kontraksi otot, keseimbangan elektrolit, dan lain sebagainya. Pada umumnya, perubahan fungsional bersifat terbalikkan dimana efek yang timbul akan segera hilang bila pemejanan racun dihentikan.

Wujud efek toksik histopatologi dan perubahan struktural dapat terjadi akibat racun yang beraksi secara langsung terhadap sel sasaran ataupun tidak langsung pada lingkungan ekstra sel, menuju pada perubahan morfologi yang akhirnya terwujud sebagai kerusakan struktural. Efek morfologis berkaitan dengan perubahan bentuk luar dan mikroskopis pada morfologi jaringan. Terdapat tiga respon histopatologi dasar sebagai tanggapan terhadap adanya luka selular tersebut yakni degenerasi, proliferasi, dan inflamasi atau perbaikan (Lu, 1995). Ketiga respon tersebut menggambarkan urutan terakhir dari serangkaian peristiwa selular setelah terjadi luka pada tingkat molekular yang dapat diperiksa dibawah mikroskop cahaya dan elektron. Oleh karena itu, dikenal dua golongan respon utama yaitu respon intrasel yang meliputi degenerasi dan proliferasi, dan respon ekstrasel yang meliputi inflamasi atau perbaikan. Berbagai respon histologi tersebut mendasari terjadinya berbagai perubahan morfologi atau struktural dalam berbagai wujud atau bentuknya seperti nekrosis, karsinogenesis, dan lain sebagainya (Donatus, 2001).

Sifat efek toksik dari suatu senyawa racun dapat bersifat terbalikkan (*reversible*) atau tak terbalikkan (*irreversible*) yang memiliki ciri masing-masing. Pada sifat yang terbalikkan, bila kadar racun yang ada dalam tempat aksi atau reseptor tertentu telah habis, maka reseptor tersebut akan kembali ke keadaan semula. Hal ini akan mengakibatkan efek toksik yang muncul akan segera kembali ke kondisi yang normal, dan ketoksikan racun tergantung pada takaran serta kecepatan absorpsi, distribusi, dan eliminasi racun tersebut. Sifat yang tak terbalikkan memiliki ciri, bahwa kerusakan yang terjadi bersifat menetap, sehingga pada pemejanan berikutnya akan mengakibatkan kerusakan yang sifatnya sama dan memungkinkan terjadinya penumpukan efek toksik. Efek yang ditimbulkan antara pemejanan dengan dosis kecil dalam jangka waktu panjang akan sama efektif dengan pemejanan dosis besar dalam jangka waktu pendek (Loomis, 1978; Priyanto, 2010).

2.5.3 Uji Toksikologi

Uji toksikologi bertujuan untuk memastikan keamanan, efektivitas maupun mutu dari suatu obat, agar obat dapat dipasarkan dan digunakan oleh konsumen. Obat diberikan pada hewan uji sebelum diberikan pada manusia melalui jalur yang memungkinkan manusia terpejan. Uji yang dilakukan berupa uji efektivitas atau selektivitas, mekanisme kerjanya, dan serangkaian tes keamanan berupa uji toksisitas dari obat tersebut (Priyanto, 2010).

Pada dasarnya, uji toksikologi dibagi menjadi dua golongan, yakni uji ketoksikan tak khas dan uji ketoksikan khas. Uji ketoksikan tak khas adalah uji toksikologi yang dirancang untuk mengevaluasi keseluruhan atau spektrum efek toksik suatu senyawa pada aneka ragam jenis hewan uji. Contoh uji ketoksikan tak khas adalah uji ketoksikan akut, subkronis, dan kronis. Uji ketoksikan akut digunakan untuk menentukan nilai LD_{50} dan dosis maksimal yang masih dapat ditoleransi oleh senyawa yang diuji. Uji ini dilakukan pengamatan selama 24 jam atau hingga 7- 14 hari untuk kasus tertentu. Pada uji ketoksikan subkronis atau subakut dilakukan dengan menggunakan 3 dosis yang diberikan dengan dosis berulang selama 4 minggu sampai 3 bulan dengan menggunakan 2 spesies yang berbeda (Donatus, 2001). Uji ketoksikan kronis dilakukan pengamatan selama 6 bulan atau lebih pada hewan roden maupun non roden. Uji ini perlu dilakukan bila obat nantinya akan digunakan dalam jangka waktu yang panjang (Priyanto, 2010). Sedangkan uji ketoksikan khas adalah uji toksikologi yang dirancang untuk mengevaluasi secara rinci efek yang khas suatu senyawa pada aneka ragam jenis hewan uji, misalnya adalah uji potensiasi, karsinogenetika, kemutagenikan, keteratogenikan, reproduksi, kulit dan mata, dan perilaku (Loomis, 1978).

2.5.4 Uji Ketoksikan Akut

Uji ketoksikan akut dirancang untuk menentukan efek toksik sesuatu senyawa yang akan terjadi dalam waktu yang singkat setelah pemejanan atau pemberiannya dengan takaran tertentu (Donatus, 2001). Untuk menyatakan toksisitas akut suatu obat, umumnya dipakai ukuran LD_{50} (dosis letal median 50), yaitu suatu dosis yang dapat membunuh 50 dari sekelompok binatang percobaan.

Demikian juga sebagai ukuran dosis efektif (dosis terapi), ukuran yang umum digunakan ialah ED₅₀ (dosis efektif median) yaitu dosis yang memberikan efek tertentu pada 50% dari sekelompok binatang percobaan (Departemen Farmakologi FK UNSRI, 2004).

Dalam melakukan uji toksisitas akut, kondisi-kondisi pada percobaan pengujian harus dicatat. Begitu juga dengan spesies dan strain binatang yang digunakan harus sama pada setiap kali dilakukan percobaan. Selain itu, cara pemberian, konsentrasi zat penambah untuk melarutkan obat atau untuk membuat bentuk suspensi, dan besarnya volume yang diberikan harus seteliti mungkin dan dicatat. Diet, suhu, lingkungan, dan variabel lain tidak selalu dapat dikontrol dengan baik sehingga diperlukan suatu standar yang berhubungan dengan pemberian obat harus diteliti sebagai pembanding (Departemen Farmakologi FK UNSRI, 2004).

2.5.5 Uji Ketoksikan Akut Oral Metode 423

Metode yang pertama kali dikeluarkan oleh OECD adalah pedoman nomor 401 (*Acute Oral Toxicity*) yang merupakan metode tradisional. Metode ini menggunakan hewan uji rodentia baik tikus atau mencit dengan mengelompokkannya berdasarkan jenis kelamin yang sama ke dalam beberapa kelompok dosis yang telah ditetapkan. Tiap kelompok terdiri dari 5 hewan uji yang dipejankan senyawa uji secara oral dan dengan dosis yang bertingkat. Uji dilakukan kembali dengan hewan uji dari jenis kelamin berbeda setelah uji pertama selesai (Sitzel dan Carr, 1999).

Untuk memperbaiki dan menggantikan metode OECD 401, OECD mengeluarkan pedoman nomor 420 (*Fixed Dose Procedure*), 423 (*Acute Toxic Class Method*), dan 425 (*Up and Down Procedure*). Semua metode tersebut menggunakan tikus atau mencit (rodentia) sebagai hewan uji dengan jenis kelamin betina. Hal ini karena hewan uji betina lebih sensitif dan untuk mengurangi jumlah hewan uji yang digunakan (OECD, 2001b).

Dalam metode OECD 420, hewan uji dikelompokkan dalam beberapa kelompok dosis yang telah ditetapkan yaitu 5, 50, 300, dan 2.000 mg/kg BB

dengan 5 hewan uji pada tiap kelompoknya. Uji pendahuluan dilakukan sebelum uji utama untuk menentukan dosis awal dengan satu hewan uji pada tiap dosis. Metode ini memberikan informasi mengenai senyawa berbahaya (*hazardous*) dan senyawa tersebut dikelompokkan sesuai dengan klasifikasi dari *Globally Harmonised System* (GHS) (OECD, 2001a).

Dalam metode OECD 425, hewan uji diberi seri dosis dengan faktor pengali 3,2 dan dosis yang dipilih harus berada dalam jarak LD₅₀ dari acuan. Pada masing-masing dosis digunakan setidaknya satu hewan uji. Pemberian dosis selanjutnya dilakukan berdasarkan satu dosis sebelumnya setelah 48 jam. Jika hewan uji hidup, maka dosis selanjutnya dinaikkan dengan faktor kenaikan 3,2. Jika hewan uji mati, maka dosis diturunkan dengan faktor penurunan 3,2. Nilai LD₅₀ metode ini ditentukan dengan program AOT425StatPgm (*Acute Oral Toxicity (Guideline 425) Statistical Program*) (OECD, 2008).

Sedangkan pada metode OECD 423, hewan uji yang digunakan lebih sedikit yaitu tiga hewan uji. Metode OECD 423 tidak dapat menentukan nilai LD₅₀ secara tepat, tetapi hanya dapat menentukan kisaran nilai dari LD₅₀. Untuk mengklasifikasikan tingkat toksisitas dari senyawa yang diuji maka digunakan satu tingkat dosis tetap. Dengan menggunakan metode ini senyawa dapat dikategorikan menurut *Globally Harmonised Classification System* (GHS) (Barile, 2008). Klasifikasi *Globally Harmonised Classification System* (GHS) dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Hewan uji yang sering digunakan adalah tikus, tapi dapat juga digunakan mencit (*rodentia*). Hewan ini dipilih karena murah, mudah didapat, dan mudah ditangani. Selain itu, juga terdapat banyak data toksikologi mengenai jenis hewan ini, sehingga lebih mudah dalam melakukan perbandingan toksisitas zat-zat kimia (Lu, 1995). Menurut OECD 423 hewan uji yang biasanya digunakan adalah betina karena betina umumnya lebih sensitif. Menurut Donatus (2001), terdapat perbedaan tingkat dan aktivitas enzim antara tikus jantan dan betina. Tikus betina memiliki kapasitas metabolisme hati lebih rendah. Sehingga uji toksisitas lebih baik digunakan tikus jantan untuk mengurangi pengaruh hormon dan kapasitas metabolisme hati yang dapat mempengaruhi kerentanan terjadinya toksisitas.

Selain itu, penentuan LD₅₀ sebaiknya dilakukan pada hewan dewasa dan yang masih muda, karena mungkin memiliki kerentanan yang berbeda (Lu, 1995). Setiap hewan uji yang digunakan harus berusia antara 8 dan 12 minggu (OECD, 2001b).

Tabel 2.1 Klasifikasi LD₅₀ pada *Globally Harmonized Classification System* (GHS)

Klasifikasi	Keterangan
Kategori 1	Nilai LD ₅₀ pada kisaran 0-5 mg/kgBB hewan uji
Kategori 2	Nilai LD ₅₀ pada kisaran >25-50 mg/kgBB hewan uji
Kategori 3	Nilai LD ₅₀ pada kisaran >200-300 mg/kgBB hewan uji
Kategori 4	Nilai LD ₅₀ pada kisaran >500-2.000 mg/kgBB hewan uji
Kategori 5	Nilai LD ₅₀ pada kisaran >2.500-5.000 mg/kgBB hewan uji
Kategori 5 atau tidak terklasifikasi	Nilai LD ₅₀ > 5.000 mg/kg BB hewan uji

(Sumber: *United Nations*, 2011)

Pemejanaan senyawa uji pada metode ini dilakukan secara peroral dengan pemberian dosis tunggal. Tetapi jika tidak memungkinkan diberi dosis tunggal, maka dapat dilakukan pemberian dengan fraksi dosis lebih kecil dalam waktu kurang dari 24 jam dengan memperhatikan volume maksimal yang dapat diberikan pada hewan uji (OECD, 2001b).

Aklimatisasi atau penyesuaian hewan uji terhadap lingkungan minimal dilakukan selama 5 hari. Hewan uji seharusnya dipuaskan sebelum dilakukan pemejanaan dengan tidak diberi makan namun tetap diberi minum selama semalam (untuk tikus) atau 3-4 jam (untuk mencit). Makanan dapat diberikan kembali 3-4 jam setelah pemejanaan untuk tikus dan 1-2 jam setelah pemejanaan untuk mencit. Tetapi, jika senyawa uji yang diberikan dalam bentuk fraksi selama lebih satu periode sebaiknya hewan uji tetap diberikan makan dan minum tergantung lama periode pemejanaan (OECD, 2001b).

Dosis yang diberikan pada metode OECD 423 sama dengan dosis pada metode OECD 420 yaitu 5, 50, 300, dan 2.000 mg/kg BB. Dosis awal dipilih berdasarkan studi pengamatan dosis yang diharapkan menimbulkan kematian pada beberapa hewan uji. Jika informasi tersebut tidak tersedia maka digunakan dosis awal 300 mg/kg BB. Sedangkan jika informasi yang ada menunjukkan pada

dosis tertinggi yaitu 2.000 mg/kg BB tidak mungkin ada kematian, maka uji batas harus dilakukan dan diberikan dosis 5.000 mg/kg BB jika masih memungkinkan untuk diberikan dengan hanya 1 kelompok saja (3 hewan uji) (OECD, 2001b).

Hewan uji diamati secara individual setelah pemberian dosis pada 30 menit pertama dilanjutkan secara periodik selama 24 jam pertama dengan pengamatan secara intensif selama 4 jam setelah pemejanaan dan dilanjutkan pengamatan setiap hari sesering mungkin selama 14 hari. Pengamatan tersebut dilakukan pada semua hewan uji yang hidup setelah pemejanaan. Bila terjadi kematian hewan uji, maka hewan tersebut harus langsung dikorbankan untuk dilihat histopatologi organnya. Lamanya pengamatan ini pun bergantung dari reaksi toksik yang muncul, waktu onset dan panjang periode pemulihan dengan demikian pengamatan dapat diperpanjang bila dianggap perlu (OECD, 2001b).

2.5.6 Histopatologi Organ

Histopatologi adalah cabang dari patologi yang memusatkan dalam menemukan dan mendiagnosis penyakit dari hasil pemeriksaan jaringan. Pemeriksaan histopatologis bertujuan untuk mengamati keadaan jaringan sebenarnya atau sedapat mungkin mendekati keadaan sebenarnya. Oleh sebab itu, diperlukan proses fiksasi jaringan untuk mencegah terjadinya perubahan dalam jaringan akibat autolisis atau dekomposisi. Bahan fiksasi yang sering digunakan adalah *buffered neutral formalin* (BNF) 10%. Mayoritas diagnosis histopatologis dilakukan dengan membuat blok parafin dari potongan jaringan sehingga mudah dipotong menjadi irisan-irisan dengan ketebalan yang diinginkan dan rata. Kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan hematoksilin dan eosin (Junqueira dan Carneiro, 2012).

Pada umumnya, wujud dan sifat efek toksik xenobiotika dianggap sebagai respon toksik sel, jaringan, atau organ tubuh terhadap aksi toksik xenobiotika. Salah satu respon yang dapat diamati adalah respon histopatologis dan perubahan struktural. Racun atau zat toksik dapat menimbulkan luka selular melalui aksi langsung pada sel sasaran atau tidak langsung pada lingkungan ekstra sel. Luka tersebut dapat mengakibatkan perubahan morfologi yang akhirnya terwujud

sebagai kekacauan struktural. Respon histopatologis dasar yang dapat timbul adalah degenerasi, proliferasi, dan inflamasi atau perbaikan (Donatus, 2001). Efek toksik pada beberapa organ dan respon histopatologinya dijelaskan sebagai berikut:

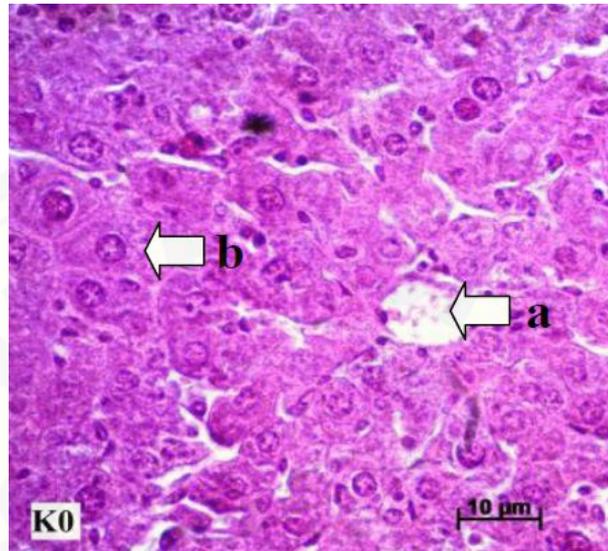
a. Hati

Hati merupakan organ terbesar di dalam tubuh dengan berat 1,5 kg atau kurang lebih 2% berat tubuh orang dewasa yang menempati sebagian besar kuadran kanan atas abdomen. Hati merupakan perantara sistem pencernaan dengan darah. Seluruh materi yang diserap melalui usus tiba di hati melalui vena porta, kecuali lipid kompleks (kilomikron) yang terutama diangkut oleh pembuluh limfe. Posisi hati dalam sistem sirkulasi sangat optimal untuk menampung, mengubah, dan mengumpulkan metabolit dari darah serta untuk menetralkan dan mengeluarkan zat toksik dalam darah. Pengeluaran ini terjadi dalam empedu yaitu suatu sekret eksokrin dari hati yang penting untuk pencernaan lipid di usus (Junqueira dan Carneiro, 2012).

Hati tersusun dari sel-sel hati yang disebut hepatosit. Hepatosit merupakan sel epitel yang berkelompok membentuk lempeng-lempeng yang saling berhubungan. Hepatosit berbentuk polihedral dengan lima sampai dua belas sisi yang tersusun membentuk lobulus hati dengan vena sentralis di pusat. Pada sudut-sudut lobulus hati terdapat tiga saluran yang dikenal sebagai triad portal, yaitu terdiri atas cabang vena porta, cabang arteri hepatis, dan duktus biliaris. Deretan hepatosit tersusun dalam deretan-deretan radier yang mengelilingi vena sentralis dengan setiap deretan yang terdiri atas dua baris sel hati dan diantaranya terdapat kanakuli biliaris. Celah di antara lempeng-lempeng yang dibentuk oleh hepatosit mengandung komponen mikrovaskular yaitu sinusoid hati (Junqueira dan Carneiro, 2012). Sinusoid dilapisi oleh sel-sel kuppfer yang membentuk suatu lapisan berpori tak-kontinyu yang secara tidak sempurna memisahkan ruang sempit disse yang memisahkan sel kupffer dari sel-sel hati (Damjanov, 2000). Gambar histologi hati normal dapat dilihat pada Gambar 2.5.

Respon hati terhadap cedera akan memperlihatkan beberapa bentuk dan melibatkan hepatosit, sel-sel vaskular atau duktus biliaris (Damjanov, 2000).

Toksikan dapat menyebabkan berbagai jenis efek toksik pada berbagai organel dalam sel hati yang mengakibatkan berbagai jenis kerusakan hati, di antaranya sebagai berikut (Lu, 1995):



Gambar 2.5 Histologi hati normal (pembesaran 400X), a: vena sentralis, b: hepatosit (Sumber: Prasetiawan *et al.*, 2012)

1) Penumpukan Intrasel

Akumulasi intrasel adalah penumpukan berbagai macam bahan di sitoplasma atau organel-organel sel. Penumpukan intrasel yang sering dijumpai adalah penumpukan air, lemak, dan aneka ragam jenis inklusi (Donatus, 2001). Penumpukan intrasel yang terjadi pada hati adalah perlemakan hati (steatosis). Perlemakan hati adalah hati yang mengandung lipid lebih dari 5%. Adanya kelebihan lemak dalam hati dapat dibuktikan secara histokimia (Lu, 1995). Perlemakan ditunjukkan dengan sel-sel hati yang bervakuola besar, vakuola-vakuola besar ini merupakan ruang-ruang dalam sitoplasma yang lemaknya terbuang sewaktu jaringan diproses. Kelainan ini bersifat reversibel (Damjanov, 2000). Gambar perlemakan hati dapat dilihat pada Gambar 2.6 A.

2) Nekrosis Hati

Nekrosis adalah perubahan *irreversible* yang terjadi sebagai respon terhadap cedera sel yang tidak dapat diperbaiki (Damjanov, 2000). Nekrosis merupakan respon degenerasi terhadap luka sel yang sering dijumpai. Keadaan ini

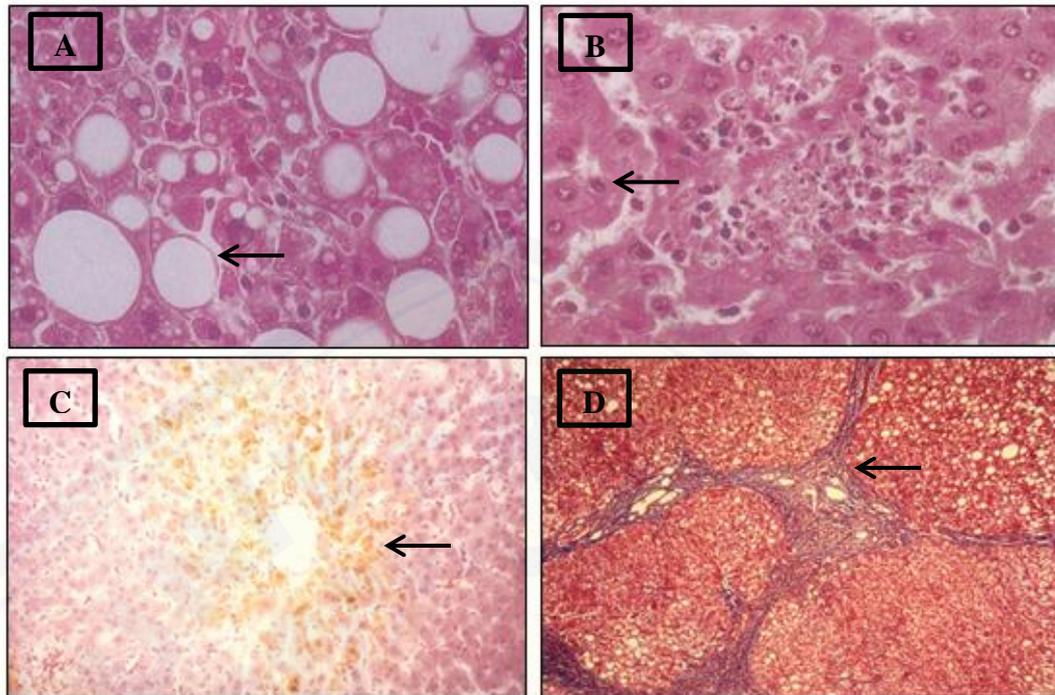
merupakan hasil akhir dari berbagai macam mekanisme sel, baik intrasel maupun ekstrasel (Donatus, 2001). Nekrosis hati adalah kematian hepatosit dan merupakan kerusakan akut. Nekrosis dapat bersifat fokal atau masif. Nekrosis hati merupakan suatu manifestasi toksik yang berbahaya tetapi tidak selalu kritis karena hati mempunyai kapasitas pertumbuhan kembali yang luar biasa. Kematian sel terjadi bersama dengan pecahnya membran plasma dan perubahan morfologik awal antara lain berupa edema sitoplasma, dilatasi retikulum endoplasma, dan disagregasi polisom. Nekrosis ditunjukkan dengan inti sel yang mengalami kerusakan dengan gambaran robeknya membran inti dan fragmentasi inti (karioreksis), lisis kromatin (kariolisis), atau menggumpalnya isi inti (piknosis) dan sitoplasma yang tersisa tampak merah (eosinofilik) (Damjanov, 2000). Gambar nekrosis hati dapat dilihat pada Gambar 2.6 B.

3) Kolestasis Hati

Kolestasis merupakan kerusakan hati yang bersifat akut, jenis kerusakan ini jarang ditemukan. Mekanisme utama kolestasis adalah berkurangnya aktivitas ekskresi empedu pada membran kanalikuli dan terjadi penyumbatan pada kanalikuli (Lu, 1995). Gambaran histopatologi khas kolestasis hepatoselular ditunjukkan adanya empedu dalam hepatosit dan ruang kanalikuli (Ermaya, 2014) yang ditandai dengan pigmen berwarna kuning pada sitoplasma dan kanakuli (Orfei, 2010). Sedangkan pada kolestasis obstruktif ditunjukkan dengan adanya penyumbatan saluran empedu interlobular, saluran portal, dan saluran empedu atau tidak terbentuknya kandung empedu (Ermaya, 2014). Gambar kolestasis hati dapat dilihat pada Gambar 2.6 C.

4) Sirosis Hati

Sirosis adalah penyakit hati kronik yang ditandai oleh fibrosis luas dan nodus-nodus regenerasi, yang menggantikan parenkim hati normal (Damjanov, 2000). Keadaan ini ditunjukkan dengan adanya septa kolagen yang tersebar pada sebagian besar hati. Kumpulan hepatosit muncul sebagai nodul yang dipisahkan oleh lapisan berserat ini. Sirosis berasal dari nekrosis sel yang tidak mengalami perbaikan dan menyebabkan aktivitas fibroblastik dan pembentukan jaringan parut (Lu, 1995). Gambar sirosis hati dapat dilihat pada Gambar 2.6 D.



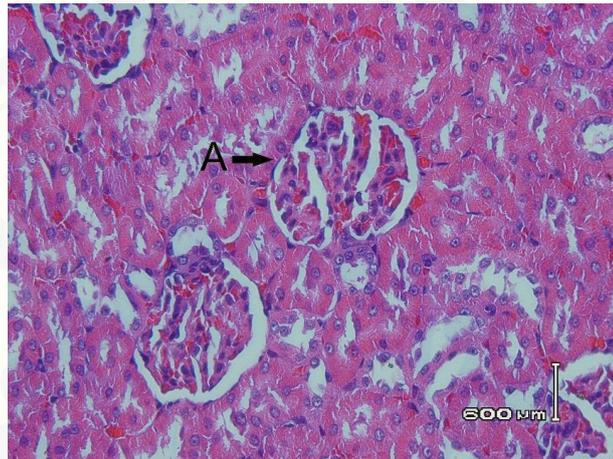
Gambar 2.6 Histopatologi hati, A: perlemakan hati ditunjukkan dengan adanya vakuola-vakuola yang besar (Sumber: Damjanov, 2000) B: Nekrosis sel hati ditunjukkan inti sel yang mengalami kariolisis, terfragmentasi menjadi debu inti (karioreksis), dan tampak memadat (piknotik) serta sitoplasma yang tampak eosinofilik (Sumber: Damjanov, 2000) C: kolestatis hati ditunjukkan dengan adanya pigmen kuning pada sitoplasma hepatosit (Sumber: Orfei, 2010) D: sirosis hati ditunjukkan dengan terbentuknya jaringan ikat berupa jaringan fibrosa kolagenosa (berwarna biru) (Sumber: Orfei, 2010)

b. Ginjal

Ginjal merupakan organ yang berperan dalam sistem urinaria. Ginjal berbentuk seperti kacang dengan hillus renalis, yaitu tempat masuknya pembuluh darah dan keluarnya ureter. Fungsi ginjal diantaranya membuang bahan sisa (terutama senyawa nitrogen seperti urea dan kreatinin), bahan asing dan produk sisanya melalui urin. Ginjal juga mengatur keseimbangan air dan elektrolit, mengatur tekanan darah, serta mempertahankan keseimbangan asam basa (Junqueira dan Carneiro, 2012).

Ginjal secara histologis adalah organ yang bersifat kompleks. Ginjal terdiri dari jutaan nefron yang merupakan unit fungsional dasar dari organ ini (Damjanov, 2000). Ukuran ginjal dalam berbagai spesies sangat bergantung pada

jumlah nefron yang memiliki fungsi dasar untuk membersihkan plasma darah dari substansi yang tidak diinginkan oleh tubuh (Ganong, 2010). Masing-masing nefron terdiri dari glomerulus, tubulus, dan duktus pengumpul yang semuanya memiliki sifat anatomis dan fungsional tersendiri (Damjanov, 2000). Gambar histologi ginjal normal dapat dilihat pada Gambar 2.7.

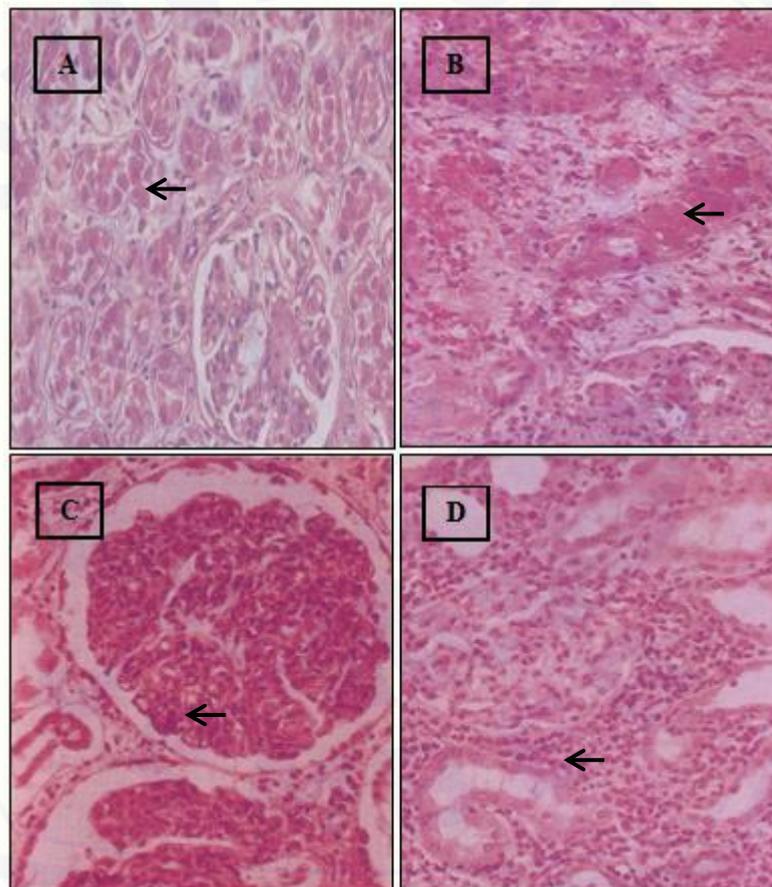


Gambar 2.7 Histologi ginjal normal, a: Glomerulus (pembesaran 400X) (Sumber: Purnamasari, 2014)

Fungsi utama ginjal adalah menyingkirkan buangan metabolisme normal dan mengekskresi xenobiotika dan metabolitnya. Hal ini dipengaruhi oleh produksi urin, suatu proses yang juga berperan dalam pemeliharaan status homeostasis tubuh (Lu, 1995). Ginjal merupakan organ yang juga terkena efek toksik jika tubuh terpapar oleh zat toksik. Ginjal merupakan salah satu organ yang rentan terhadap efek toksik, karena ginjal menerima 25% dari *cardiac output*, sehingga sering dan mudah kontak dengan zat kimia dalam jumlah besar. Ginjal sebagai jalur obligatorik untuk sebagian obat, sehingga insufisiensi ginjal meningkatkan konsentrasinya dalam cairan tubulus. Secara mendasar ginjal akan mendapat efek langsung dari senyawa toksik (Lu, 1995). Kelainan ginjal sebagai bentuk efek toksik yang dapat terjadi adalah berupa kerusakan seperti nekrosis dan peradangan pada glomerulus atau tubulus ginjal.

Nekrosis pada ginjal ditunjukkan dengan sel-sel yang tidak memiliki inti dan sitoplasma yang tampak merah (eosinofilik) (Damjanov, 2000). Inflamasi atau peradangan merupakan suatu proses yang dinamis, luas, dan sifatnya

beragam sesuai dengan sifat, tingkat, dan lamanya luka (Donatus, 2001). Peradangan melibatkan perubahan sel, humoral, dan vaskular. Peradangan dibagi menjadi dua, yakni peradangan akut dan kronik. Peradangan yang terjadi pada glomerulus disebut sebagai glomerulonefritis, sedangkan peradangan yang dapat terjadi akibat suatu toksin pada tubulus disebut sebagai nefritis tubulointerstitium. Kelainan tubulus biasanya berkaitan dengan infiltrasi sel di interstisium yang umumnya berperan dalam reaksi imun. Peradangan ditunjukkan oleh hiperselularitas sel-sel radang seperti eosinofil, limfosit, dan sel plasma (Damjanov, 2000). Histopatologi pada ginjal dapat dilihat pada Gambar 2.8.

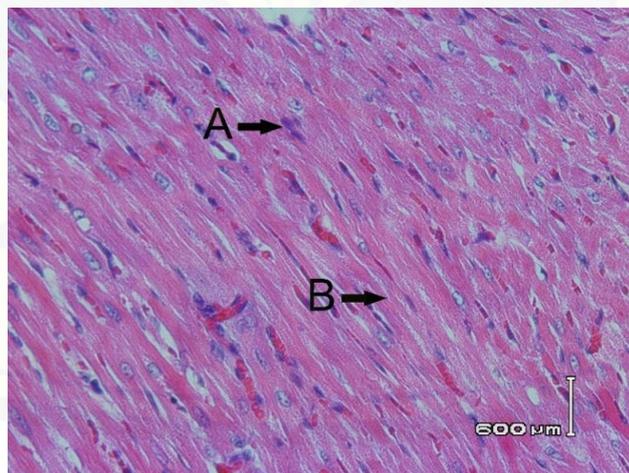


Gambar 2.8 Histopatologi ginjal, A: nekrosis koagulasi ginjal ditunjukkan dengan sel yang tidak memiliki inti dan sitoplasma yang tersisa tampak merah (eosinofilik), B: nekrosis tubulus ditunjukkan dengan tubulus proximal yang tidak memiliki inti dan sitoplasma yang tersisa tampak merah (eosinofilik), C: glomerulonefritis ditunjukkan dengan hiperselularitas dan proliferasi sel-sel radang pada glomerulus, D: nefritis tubulointerstitium ditunjukkan dengan interstisium mengalami sebaran padat limfosit, eosinofil, dan sel plasma pada tubulus (Sumber: Damjanov, 2000)

c. Jantung

Jantung adalah organ berotot yang berkontraksi secara ritmis yang memompa darah melalui sistem sirkulasi. Jantung memiliki empat ruang yaitu dua atrium dan dua ventrikel. Ventrikel kanan dan kiri memompa darah masing-masing ke paru-paru dan bagian tubuh yang lain. Sedangkan atrium kanan dan kiri menerima darah masing-masing dari tubuh dan vena pulmonaris. Dinding pada semua ruang tersebut memiliki tiga lapisan yaitu endokardium, miokardium, dan epikardium (Junqueira dan Carneiro, 2012).

Jantung memiliki empat ruang yaitu dua buah atrium dan dua buah ventrikel. Dinding semua ruang jantung memiliki tiga lapisan, yakni endokardium, miokardium, dan epikardium. Endokardium membungkus bagian dalam atrium dan ventrikel serta daun katup trikuspid, pulmonaris, mitral dan aorta. Miokardium terdiri dari sel-sel otot serat lintang yang saling dihubungkan menjadi suatu sinsitium, sedangkan epikardium membentuk permukaan luar jantung. Lapisan ini meluas menjadi perikardium dan permukaannya dilapisi oleh sebuah lapisan sel-sel mesotel gepeng (Damjanov, 2000). Gambar histologi normal jantung dapat dilihat pada Gambar 2.9.



Gambar 2.9 Histologi jantung normal. A: Myocardium, B: Desmosom (pembesaran 400X) (Sumber: Purnamasari, 2014)

Jantung adalah organ yang vital dalam tubuh. Jantung dapat dirusak oleh berbagai jenis zat kimia. Zat itu bekerja secara langsung pada otot jantung atau

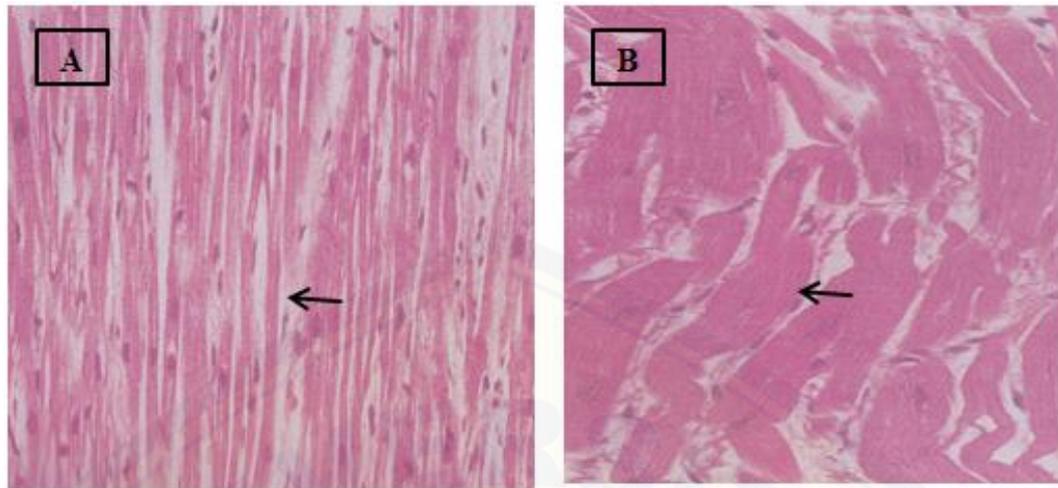
secara tidak langsung melalui susunan saraf atau pembuluh darah. Otot jantung berbeda dari otot rangka. Otot jantung mengandung bahan kontraktile lebih sedikit dan bahan mitokondria lebih banyak dibanding otot rangka. Mitokondria pada jantung berperan penting dalam kontraktilitas jantung dan sering menjadi sasaran kardiotoxicitas subletal (Lu, 1995). Berikut efek toksik secara histologi yang dapat timbul pada jantung:

1) Atrofi Jantung

Atrofi adalah mengecilnya sel atau berkurangnya jumlah sel yang menyebabkan penyusutan atau pengerutan jaringan atau organ yang terpengaruh. Atrofi merupakan salah satu bentuk adaptasi yang ditandai oleh berkurangnya ukuran sel (Damjanov, 2000). Keadaan ini terjadi ketika sel berada pada lingkungan atau keadaan yang tidak memenuhi atau membahayakan, sehingga sel perlu mengecil sampai ke tingkat dimana sel dapat melangsungkan kehidupannya (Donatus, 2001). Atrofi jantung ditunjukkan dengan serat-serat otot jantung yang tampak menipis, bervakuola, dan lebih pucat daripada normal karena mengandung lebih sedikit miofilamen (Damjanov, 2000). Gambar atrofi jantung dapat dilihat pada Gambar 2.10 A.

2) Kardiomiopati

Kardiomiopati yang sering terjadi adalah kardiomiopati hipertrofik. Pada kelainan ini menyebabkan hipertrofi miokardium ventrikel yang sering menimbulkan penebalan asimetrik septum antarventrikel. Secara histologis, bentuk kardiomiopati ini ditandai oleh hipertrofi miosit dan disorganisasi berkas-berkas miokardium. Hipertrofi jantung ditunjukkan dengan serat-serat otot tampak tebal dan eosinofilik yang mencerminkan banyaknya filamen aktin dan miosin dalam sitoplasma serta inti membesar. Hipertrofi dapat terjadi pada otot rangka, jantung, dan otot polos (Damjanov, 2000). Gambar hipertrofi jantung dapat dilihat pada Gambar 2.10 B.



Gambar 2.10 Histopatologi jantung, A: atrofi jantung ditunjukkan serat-serat otot tampak menipis dan pucat, B: hipertrofi jantung ditunjukkan dengan serat-serat otot yang tampak tebal dan eosinofilik (Sumber: Damjanov, 2000)

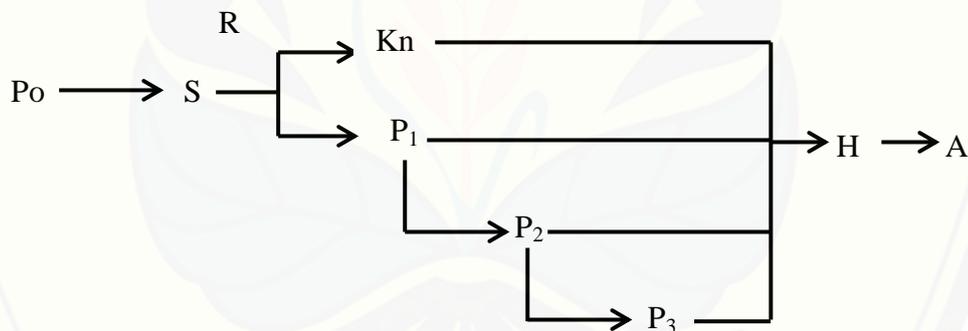
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul akibat adanya suatu perlakuan tertentu. Jenis penelitian ini adalah *true experimental laboratories* (Notoatmodjo, 2012).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah *the post test only control group design*. Rancangan penelitian ini terbagi atas kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dilihat histopatologi organnya pada akhir penelitian (Notoatmodjo, 2012). Rancangan penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 3.1:



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan:

- Po = Populasi tikus
- S = Sampel
- R = Pengelompokan tikus secara *simple random sampling* dengan setiap kelompok terdiri dari 3 hewan uji
- Kn = Kelompok kontrol normal dengan pemberian CMC Na dan Tween

- P_1 = Kelompok perlakuan dengan pemberian kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella dosis 2.000 mg/kg BB dan diamati selama 14 hari
- P_2 = Replikasi kelompok perlakuan apabila pada P_1 tidak terdapat tikus yang mati atau mati satu ekor. Kelompok perlakuan diberikan kembali kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella dosis 2.000 mg/kg BB dan diamati selama 14 hari
- P_3 = Kelompok perlakuan apabila pada P_2 tidak terdapat tikus yang mati atau mati satu ekor. Kelompok perlakuan diberikan kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella dosis 5.000 mg/kg BB dan diamati selama 14 hari
- H = Histopatologi organ setelah pemberian kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella pada kelompok perlakuan P_3 dan kontrol normal yaitu seluruh tikus dikorbankan dan diambil organnya (hati, ginjal, dan jantung) untuk dilakukan pemeriksaan histopatologinya
- A = Analisis data

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Jember, dan Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Penelitian ini dimulai pada 11 Maret 2015 sampai dengan 7 Maret 2016.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Subyek Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan galur Wistar dengan umur 8-12 minggu, sehat dan memiliki berat 100-150 gram.

3.4.2 Alat

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat-alat gelas, *grinder mixer* (Orsatti Single Phase Motor), *rotary evaporator* (Laborotta 4000-efficient), oven (Memmert), panci infus, kompor gas, *freeze dryer* (Zirbus VacO 5-II-D), aluminium foil, spatula, timbangan analitik (PioneerTM OHAUS), alat-alat bedah (pinset, gunting, papan), kandang tikus, botol minum tikus, mortir, stamper, spuit injeksi oral 5 mL (One Med), pot plastik tempat organ, dan mikroskop cahaya (Olympus Bx53T).

3.4.3 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jati belanda, kelopak bunga rosella, akuades (Aquadm Brataco), etanol 95%, CMC Na, tween (Brataco), formalin, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, kloroform (Emsure[®]), hemaktosilin, dan eosin.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah peringkat dosis kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella dengan perbandingan 1:1 dalam mg/kg berat badan.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah berat badan tikus, berat organ dan histopatologi organ hati, ginjal, dan jantung setelah dilakukan pemejanaan kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella dengan dosis awal 2.000 mg/kg berat badan.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dari penelitian ini adalah metode ekstraksi, volume dosis perlakuan, waktu perlakuan, galur tikus, umur tikus, berat badan awal tikus,

jenis kelamin tikus, jenis pakan dan minuman, kondisi lingkungan, lamanya pengkondisian sebelum pengujian, jalur pemejanaan dari senyawa uji.

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- a. Daun jati belanda dikumpulkan dari daerah Kabupaten Banyuwangi pada bulan Januari tahun 2015. Daun jati belanda yang digunakan adalah daun muda dan daun tua yang berasal dari pohon berumur 5 sampai 7 tahun. Terlampir surat keterangan identifikasi tumbuhan dari UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi dengan nomor surat: No.1608/IPH.06/HM/XI/2015 (Lampiran A.1).
- b. Kelopak bunga rosella dikumpulkan dari daerah Kabupaten Jember pada bulan Februari tahun 2015. Kelopak bunga rosella yang digunakan adalah dari bunga yang sudah berwarna merah dan tua yang berasal dari tanaman berumur 7 sampai 8 bulan. Terlampir surat keterangan identifikasi tumbuhan dari UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi dengan nomor surat: No.1607/IPH.06/HM/XI/2015 (Lampiran A.2).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Ekstraksi Daun Jati Belanda

Daun jati belanda dicuci bersih dengan air dan dikeringkan pada 50°C dalam oven, dipotong dadu kecil-kecil, dihaluskan menggunakan *grinder mixer*, kemudian serbuk kering ditimbang sejumlah yang diperlukan dan dimaserasi dengan etanol 95% selama 24 jam. Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring dan residu dimaserasi lagi dengan etanol 95% selama 24 jam. Ekstrak etanol diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada 60°C di bawah tekanan (Sari *et al.*, 2013).

3.7.2 Ekstraksi Kelopak Bunga Rosella

Kelopak bunga rosella dicuci bersih dengan air dan dikeringkan pada 50°C dalam oven, dipotong dadu kecil-kecil, dihaluskan dalam *grinder mixer*, kemudian serbuk kering ditimbang sejumlah yang diperlukan, ditambahkan air

sehingga diperoleh konsentrasi simplisia 10%. Ekstraksi dilakukan dengan pemanasan dengan suhu 90°C selama 15 menit (Depkes RI, 1995). Setelah itu disaring dan dikeringkan menggunakan *freeze dryer*.

3.7.3 Uji Toksisitas Akut

a. Aklimatisasi dan Pengelompokan Hewan Uji

Aklimatisasi adalah penyesuaian terhadap lingkungan. Berdasarkan metode OECD 423, lingkungan yang baik untuk hewan coba adalah suhu ruang yaitu 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). Suhu ruang kandang hewan uji pada penelitian ini kurang lebih 25°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). Aklimatisasi dilakukan selama 5 hari dengan dilakukan pemuasaan (tidak diberikan makanan tapi tetap diberikan minum) selama semalam sebelum dilakukan pemejanaan terhadap hewan uji. Hewan uji dapat diberikan makan lagi 3-4 jam setelah pemejanaan. Tujuan dari aklimatisasi adalah agar hewan uji dalam kondisi yang stabil, telah mengenal lingkungan untuk percobaan dan tidak ada stress yang mungkin dapat mempengaruhi penelitian yang dilakukan. Pemuasaan dilakukan untuk mengurangi pengaruh makanan terhadap pemejanaan bahan uji.

Hewan uji dipilih secara acak, dilakukan penandaan untuk memudahkan identifikasi dan dikelompokkan. Pengelompokan hewan uji berdasarkan metode OECD 423, yaitu tiap kelompok pemberian terdiri dari 3 ekor tikus. Baik kelompok pemejanaan baru untuk dosis yang berbeda maupun kelompok pengulangan dosis dan kelompok kontrol (OECD, 2001a).

b. Penentuan Tingkat Dosis Awal Uji Ketoksikan Akut dengan Metode OECD 423

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Utomo dan Wijayahadi (2008) diketahui bahwa ekstrak daun jati belanda memiliki nilai LD₅₀ di atas 5.000 mg/kg BB yaitu lebih dari 6.324,14 mg/kgBB. Sama halnya dengan daun jati belanda, berdasarkan penelitian ketoksikan akut yang dilakukan oleh Onyenekwe *et al.* (1999) diketahui bahwa infus kelopak rosella memiliki nilai LD₅₀ lebih dari 5.000 mg/kg BB. Dikarenakan pada penelitian ini akan dilakukan uji toksisitas terhadap kombinasi dari ekstrak daun jati belanda dan ekstrak kelopak bunga rosella, maka dimungkinkan dapat terjadi toksisitas yang lebih tinggi dan memiliki nilai LD₅₀

kurang dari 5.000 mg/kg BB, sehingga ditetapkan dosis awal untuk penelitian ini adalah 2.000 mg/kg BB.

c. Pembuatan Suspensi Kombinasi Ekstrak Daun Jati Belanda dan Ekstrak Kelopak Bunga Rosella pada Tingkat Dosis Tertentu

1) Pembuatan Na CMC 0,5%

Suspensi kombinasi ekstrak daun jati belanda dan ekstrak kelopak bunga rosella dibuat dengan mencampurkan bahan uji dengan pensuspensi CMC Na 0,5 % dan tween sebanyak 1% dari sediaan uji. CMC Na 0,5 % dibuat dengan menimbang 1 gram CMC Na kemudian dikembangkan menggunakan akuades hangat sejumlah 20 kali beratnya. Setelah CMC Na mengembang lalu digerus dengan ditambahkan akuades hingga volume 200 ml dengan menggunakan labu takar.

2) Perhitungan Stok untuk Dosis yang akan Dibuat

Dalam penelitian ini digunakan ekstrak daun jati belanda dan ekstrak kelopak bunga rosella dengan perbandingan 1:1 dengan anggapan kedua ekstrak tersebut memiliki potensi efek yang sama. Kedua ekstrak tersebut kemudian dicampur dan disuspensikan menggunakan CMC Na 0,5% dan Tween sebanyak 1% dari sediaan uji yang dibuat. Berikut perhitungan pembuatan sediaan uji kombinasi ekstrak daun jati belanda dan ekstrak kelopak bunga rosella:

a) Pembuatan sediaan ekstrak dosis 2.000mg/kg BB

Misal berat badan tikus 150 gram.

$$\frac{2.000 \text{ mg}}{1.000 \text{ g}} = \frac{x \text{ mg}}{150 \text{ g}}$$

$$x = 300 \text{ mg ekstrak}$$

Kombinasi ekstrak daun jati belanda dan kelopak bunga rosella dibuat dengan perbandingan 1:1, sehingga dibutuhkan ekstrak daun jati belanda sebanyak 150 mg dan ekstrak kelopak bunga rosella sebanyak 150 mg. Untuk membuat larutan stok bahan uji sebanyak 25 ml dibutuhkan 3.750 mg ekstrak (1.875 mg ekstrak daun jati belanda dan 1.875 mg ekstrak kelopak bunga rosella) dengan perhitungan sebagai berikut:

Bahan uji dengan dosis 2.000 mg/kg BB dan volume pemejanan 2 ml untuk 150 gram tikus.

$$\begin{aligned} \text{Stok} &= \frac{\text{dosis (mg/kgBB)} \times \text{berat badan (kg)}}{\text{volume pemberian (ml)}} \\ &= \frac{2.000 \text{ mg/kgBB} \times 150 \text{ g}}{2 \text{ ml} \times 1.000} \\ &= 150 \text{ mg/ml} \\ &= 3.750 \text{ mg/25 ml} \end{aligned}$$

b) Pembuatan sediaan ekstrak dosis 5.000mg/kg BB

Misal berat badan tikus 150 gram.

$$\begin{aligned} \frac{5.000 \text{ mg}}{1.000 \text{ g}} &= \frac{x \text{ mg}}{150 \text{ g}} \\ x &= 750 \text{ mg ekstrak} \end{aligned}$$

Kombinasi ekstrak daun jati belanda dan kelopak bunga rosella dibuat dengan perbandingan 1:1, sehingga dibutuhkan ekstrak daun jati belanda sebanyak 375 mg dan ekstrak kelopak bunga rosella sebanyak 375 mg. Untuk membuat larutan stok bahan uji sebanyak 25 ml dibutuhkan 9.375 mg ekstrak (4.687,5 mg ekstrak daun jati belanda dan 4.687,5 mg ekstrak kelopak bunga rosella), dengan perhitungan sebagai berikut:

Bahan uji dengan dosis 5.000 mg/kg BB dan volume pemejanan 2 ml untuk 150 gram tikus.

$$\begin{aligned} \text{Stok} &= \frac{\text{dosis (mg/kgBB)} \times \text{berat badan (kg)}}{\text{volume pemberian (ml)}} \\ &= \frac{5.000 \text{ mg/kgBB} \times 150 \text{ g}}{2 \text{ ml} \times 1.000} \\ &= 375 \text{ mg/ml} \\ &= 9.375 \text{ mg/25 ml} \end{aligned}$$

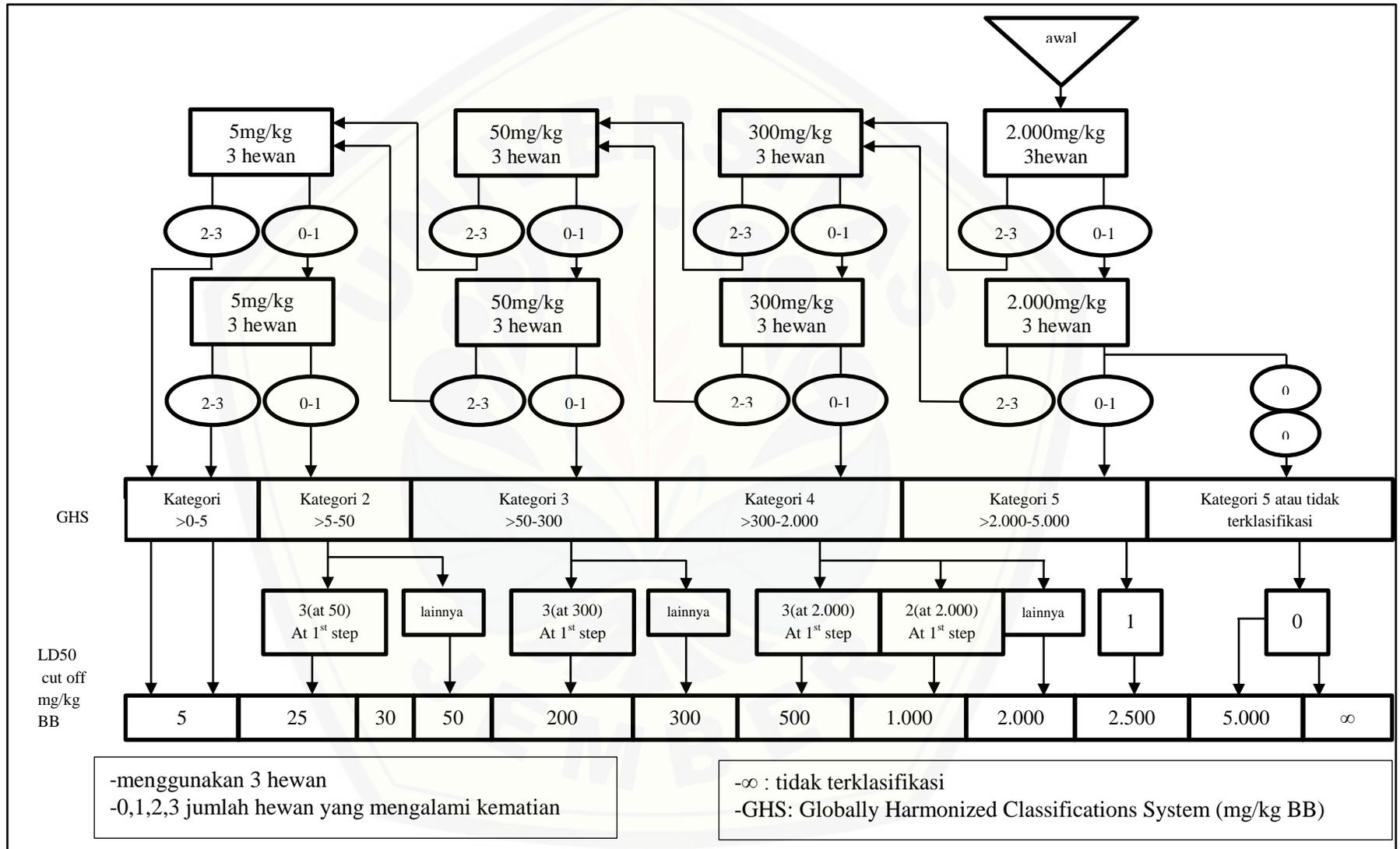
Suspensi sediaan kombinasi ekstrak daun jati belanda dan ekstrak kelopak bunga rosella dibuat sebanyak 25 ml. Masing-masing bahan uji ditimbang dengan berat yang tertera di atas, kemudian ditambahkan suspensi CMC Na 0,5% sebanyak 10 ml dan tween sebanyak 1% dari sediaan uji yakni 0,25 ml sambil

diaduk hingga homogen menggunakan mortir dan stamper. Lalu sampel dipindahkan ke dalam labu takar 25 ml dan ditambahkan lagi suspensi CMC Na 0,5% hingga tanda batas lalu dikocok hingga homogen.

d. Uji Ketoksikan Akut dengan Metode OECD 423 (*Acute Toxic Class Method*)

Langkah awal dalam melakukan uji toksisitas akut adalah aklimatisasi dan pengelompokan hewan uji yang dipilih secara acak. Sebelum dipejankan, hewan uji ditimbang terlebih dahulu dan dihitung volume pemberian untuk masing-masing hewan uji untuk dosis awal 2.000 mg/kg BB. Pemejanaan dilakukan pada kelompok perlakuan yaitu kelompok kombinasi ekstrak perbandingan 1:1 yang terdiri dari tiga ekor tikus. Setelah itu, dilakukan pengamatan secara intensif setiap 30 menit selama 4 jam pertama. Pengamatan dilakukan dengan mengamati tingkah laku hewan coba sebagai gejala toksik yang muncul terutama bila ada kematian hewan uji. Jika terdapat 2-3 hewan uji yang mati, maka dosis diturunkan menjadi 300 mg/kg BB dan dilakukan pemejanaan pada 3 hewan uji yang baru. Jika terdapat satu atau tidak ada sama sekali kematian hewan uji, maka dilakukan pengulangan dosis, yaitu dilakukan pemejanaan dengan dosis 2.000 mg/kg BB kembali pada 3 hewan uji yang baru. Apabila tetap tidak ada yang mati maka dosis dapat ditingkatkan menjadi 5.000 mg/kg BB dan pemejanaan dilakukan pada 3 hewan uji yang baru. Begitu seterusnya, hingga ditemukan nilai LD_{50} *cut off* yang telah dikategorikan oleh GHS (*Globally Harmonised Classification System*).

Kelompok kontrol normal uji toksisitas ini adalah tiga ekor tikus yang dipejani suspensi CMC Na 0,5% dan tween 1% dari sediaan yang dibuat. Kelompok kontrol normal ini diuji untuk mengetahui pengaruh CMC Na dan tween terhadap hewan uji setelah pemejanaan, karena CMC Na dan tween digunakan sebagai pensuspensi sediaan uji kombinasi ekstrak daun jati belanda dan ekstrak kelopak bunga rosella. Skema alur pengujian ketoksikan oral akut metode OECD 423 dengan dosis awal 2.000 mg/kg BB dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Skema alur pengujian ketoksikan oral akut metode OECD 423 dengan dosis awal 2.000 mg/kg BB (OECD, 2001a)

3.7.4 Pengamatan

Apabila terjadi kematian pada hewan uji, maka hewan uji langsung dikorbankan dan dilakukan histopatologis organ dan jika hewan uji masih hidup, maka dilakukan pengamatan tingkah laku hewan coba sebagai gejala toksik yang muncul pada semua hewan uji secara intensif pada tiap 30 menit setelah pemberian sediaan selama 4 jam dan diteruskan pengamatan hingga 24 jam sesering mungkin. Pengamatan berlangsung selama 14 hari dan dilakukan setiap hari sesering mungkin. Selain itu, juga dilakukan penimbangan berat badan tikus pada semua kelompok sebelum pemberian sediaan yang merupakan hari pertama dan pada hari terakhir pengamatan yaitu hari ke-14, untuk mengetahui pengaruh pemejanan kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella terhadap kenaikan atau penurunan berat badan.

3.7.5 Histopatologi Organ

Hewan uji yang mati setelah pemejanan, langsung dikorbankan, diambil organnya dan dilakukan pembuatan preparat dan pemeriksaan histopatologi organ. Sedangkan hewan uji yang hidup, pada hari ke 14 dikorbankan, diambil organnya dan dilakukan pemeriksaan histopatologi organ terutama pada hewan uji yang menunjukkan gejala ketoksikan. Organ yang diamati yaitu hati, ginjal, dan jantung. Pemeriksaan histopatologi organ dilakukan untuk melihat pengaruh pemberian bahan uji terhadap organ yang mungkin memberikan efek toksik karena efek tertunda.

Hewan dikorbankan menggunakan kloroform yaitu dengan cara hewan uji diletakkan dalam wadah tertutup berisi kapas yang sudah dibasahi dengan kloroform dan dilakukan dislokasi pada leher hewan uji. Jika hewan uji telah mati, maka pembedahan harus segera dilakukan, sehingga kloroform tidak mempengaruhi organ dalam penelitian. Organ yang diambil dibersihkan dengan akuades dan diawetkan dalam *buffered neutral formalin* (BNF) 10%. Sebelum diawetkan, tiap organ ditimbang untuk mengetahui pengaruh pemberian bahan uji terhadap berat organ hewan uji. Organ dapat menjadi lebih berat karena mungkin

terjadi pembengkakan dan menjadi lebih ringan karena sel yang mengecil atau berkurangnya jumlah sel yang disebut atrofi.

3.8 Analisis Data

Pengamatan dilakukan terhadap data hasil histopatologis organ. Bila terjadi perubahan pada organ karena pemejanaan bahan uji, maka dapat diketahui potensi ketoksikan bahan uji terhadap organ hati, ginjal, dan jantung hewan uji. Analisis untuk hasil histopatologis organ dilakukan dengan analisis deskriptif. Selain itu, juga dilakukan analisis pada berat organ dan berat badan hewan. Data berat badan tikus dianalisis dengan menghitung purata perubahan berat badan per hari menggunakan rumus sebagai berikut:

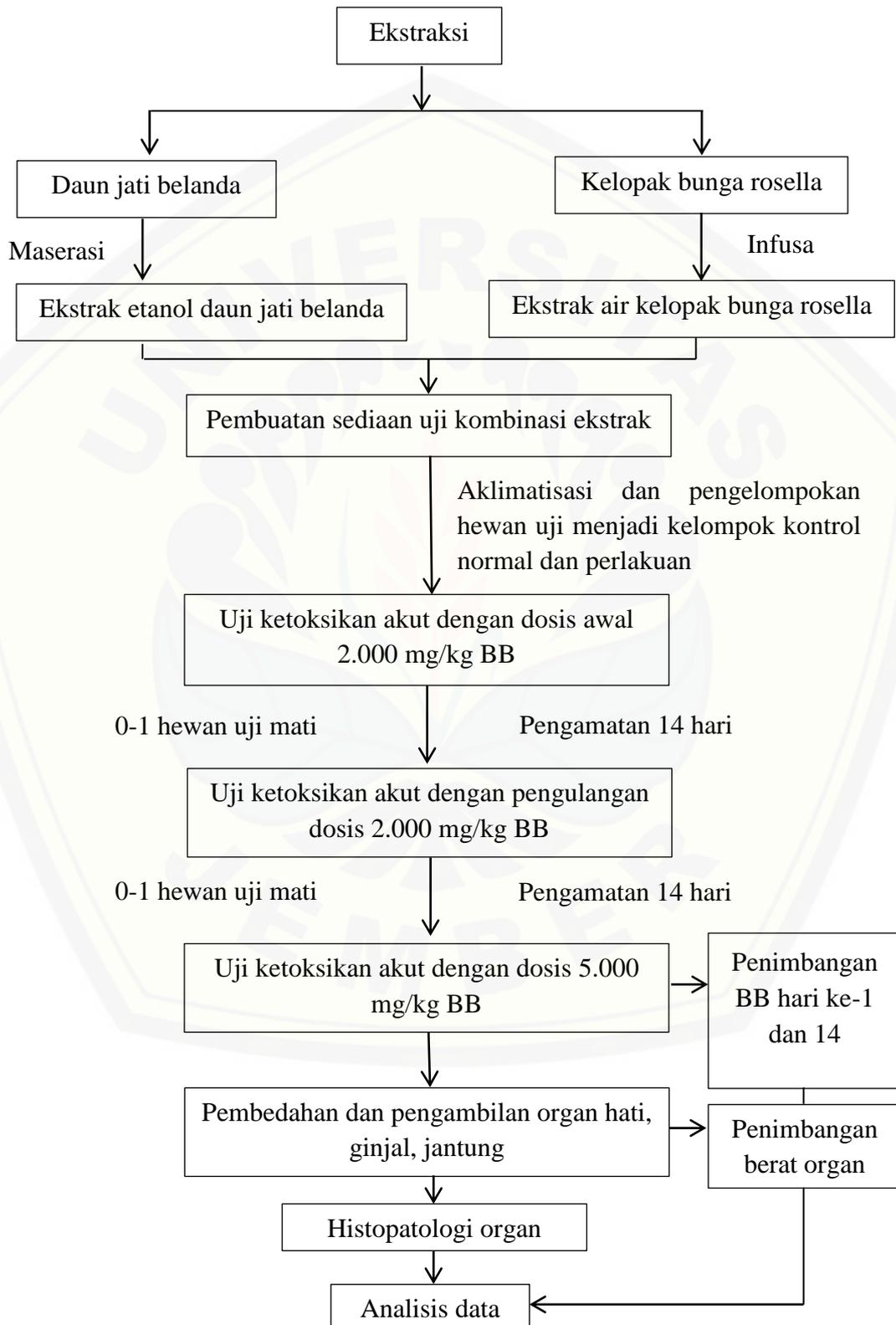
$$\text{Purata perubahan BB per hari} = \frac{(\text{BB hari terakhir} - \text{BB hari pertama}) \text{ gram}}{\text{banyak hari pengamatan}}$$

Kemudian data berat organ dan berat badan tikus tersebut dianalisis dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk* untuk melihat normalitas data dan dianalisis dengan uji *Levene* untuk melihat homogenitas data. Jika data terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji-T tidak berpasangan (independen) dengan taraf kepercayaan 95%. Uji-T untuk data tidak berpasangan dilakukan terhadap dua kelompok data yang tidak saling berkaitan antara satu dengan lainnya (Besral, 2010).

Jika data tidak berdistribusi normal, maka harus dilakukan transformasi data terlebih dahulu untuk menormalkan distribusinya. Jika transformasi yang dilakukan tidak mampu menormalkan distribusi data tersebut, maka uji-T tidak valid untuk dipakai, sehingga disarankan untuk melakukan uji non-parametrik *Mann-Whitney* untuk data tidak berpasangan (independen) (Besral, 2010).

3.9 Skema Alur Penelitian

Skema alur penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.3 sebagai berikut:



Gambar 3.3 Skema alur penelitian

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa kombinasi ekstrak etanol daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella dengan perbandingan 1:1 menyebabkan perubahan histopatologi pada organ ginjal, namun tidak menyebabkan perubahan histopatologi pada organ hati dan jantung.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan peneliti adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut terkait fungsi organ ginjal menggunakan parameter kimiawi seperti pemeriksaan serum ureum dan kreatinin
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yaitu uji toksisitas subkronis dan kronis pada kombinasi ekstrak air daun jati belanda dan ekstrak air kelopak bunga rosella.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, M. G., Lawal, A., Suleiman, B., dan Abdullahi, K. 2010. Hepatorenal Toxicity Studies of Sub-Chronic Administration of Calyx Aqueous Extracts of *Hibiscus Sabdariffa* in Albino Rats. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*. Vol. 3(1): 16-19.
- Aguilar, F. J. A., Zamilpa, A., Garcia, M. D. P., Perez, J. C. A., Nuñez, E. R., Sepulveda, E. A. C., Carrillo, L. I. V., dan Ramosa, R. R., 2007. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on Obesity in MSG Mice. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 114: 66–71.
- Apollo. *Rosella: Origin, Uses & Dosage*. <https://naturalplanttherapy.com/rosella-origin-uses-dosage/>. [07 Desember 2015].
- Ariens, E. J., Mutschler, E., dan Simonis, A. M. 1994. *Toksikologi Umum Pengantar*. Terjemahan oleh Yoke R. Wattimena, Mathilda B. Widiyanto, Elin Yulinah Sukandar. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Backer, dan Van B. D. B. 1965. *Flora of Java*. Groningen: N. V. P. Noordhoff.
- Baradero, M., Dayrit, M. W., dan Siswadi, Y. 2008. *Klien Gangguan Ginjal*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Barile, F. A. 2008. *Principle of Toxicology Testing*. New York: CRC Press.
- Balasz, T. 1970. *Measurement of Acute Toxicity, in Paget, G.E, (Ed) Methods in Toxicology*. Oxford & Edinburgh: Blackwell Scientific Publications.
- Besral. 2010. *Pengolahan dan Analisa Data-1 Menggunakan SPSS*. Depok: Departemen Biostatistika Fakultas Kesehatan Masyarakat UI.
- Damjanov, I. 2000. *Histopatologi: Buku Teks dan Atlas Berwarna*. Terjemahan oleh Brahm U. Pendit. Jakarta: Widya Medika.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1979. *Materia Medika Indonesia*. Jilid 3. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi 4. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Weels, B. G., dan Posey, L. M. 2008. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*. Edisi 8. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.

- Donatus, I. A. 2001. *Toksikologi Dasar*. Yogyakarta: Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi UGM.
- Ermaya, Y. S. 2014. *Kolestasis: Bagaimana Deteksi Dini*. <http://pghnai.com/kolestasis.html>. [05 Januari 2015].
- Fakeye, T. O., Pal, A., Bawankule, D. U., Yadav, N. P., dan Khanuja, S. P. S. 2008. Toxic Effects of Oral Administration of Extracts of Dried Calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Malvaceae). *Phytotherapy Research*. Vol. 23(3): 412-416.
- Ganong, W. F. 2010. *Review of Medical Physiology*. Edisi 23. California: Lange Medical.
- Hatma, R. D. 2011. Sosial Determinan dan Faktor Resiko Kardiovaskular. *Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan*. Vol. 2(2):15-21.
- Havsteen, B. H. 2002. The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids. *Pharmacology and Therapeutic*. Vol. 96. 67-202.
- Hopkins, A. L., Lamm, M. G., Funk, J. L., dan Ritenbaugh, C. 2013. *Hibiscus sabdariffa* L. in the Treatment of Hypertension and Hyperlipidemia: A Comprehensive Review of Animal and Human Studies. *Fitoterapia*. Vol. 85: 84-94.
- Iswantini, D., Silitonga, R. F., Martatilofa, E., dan Darusman, L. K. 2011. *Zingiber cassumunar*, *Guazuma ulmifolia*, and *Murraya paniculata* Extracts as Antiobesity: In Vitro Inhibitory Effect on Pancreatic Lipase Activity. *Hayati Journal of Biosciences*. Vol. 18 (1): 6-10.
- Jalpa, P., Ashish, D., Patel, A. A., dan Patel, N. M. 2012. Ethnomedicinal, Phytochemical and Preclinical Profile of *Guazuma ulmifolia* Lam. *Pharma Science Monitor an International Journal Pharmaceutical Science*. Vol. 3 (2): 66-78.
- Junqueira, L. C., dan Carneiro, J. 2012. *Histoteknik Dasar*. Edisi 10. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2014. *Situasi Kesehatan Jantung*. Jakarta Selatan: Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kumar, K. H. 2013. A Review on Hyperlipidemic. *International Journal Of Novel Trends In Pharmaceutical Sciences*. Vol. 3 (4): 59-71.

- Lin, T., Lin, H., Chen, C., Lin, M., Chou, M., dan Wang, C. 2007. *Hibiscus sabdariffa* Extract Reduces Serum Cholesterol in Men and Women. *Nutrition Research*. Vol. 27: 140-145.
- Loomis, T. A. 1978. *Essentials of Toxicology*. Edisi 3. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Lu, F.C. 1995. *Toksikologi dasar: Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Resiko*. Terjemahan oleh Nugroho. Jakarta: UI Press.
- Maldini, M., Mico, S. D., Montoro, P., Darra, E., Mariotto, S., Bifulco, G., Pizza, C., dan Piacente, S. 2013. Flavanocoumarins from *Guazuma ulmifolia* Bark and Evaluation of Their Affinity for STAT1. *Phytochemistry*. Vol. 86: 64-71.
- Maynard, L., A., dan J., K., Loosli. 1979. *Animal Nutrition*. Edisi 4. New York: McGraw Hill Book Company Inc.
- Mcgavin, M. D., Zachary, J. F., Mosby-Elsevier, Louis, St., Missouri. 2007. Pathologic Basis Of Veterinary Disease. Edisi 4. *The Canadian Veterinary Journal*. Vol. 48(7): 724.
- Notoatmodjo, S. 2012. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Onyenekwe, P. C., Ajani, E. O., Ameh, D. A., dan Gamaniel, A. S. 1999. Antihypertensive Effect of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) Calyx Infusion in Spontaneously Hypertensive Rats and a Comparison of its Toxicity with that in Wistar Rats. *Cell Biochemistry and Function*. Vol. 17: 199-206.
- Prommetta, P., Phivthong-ngam, L., Chaichantipyuth, C., Niwattisaiwong, N., dan Lawanprasert, S. 2006. Aqueous Extract of the Calyces of *Hibiscus sabdariffa* Linn.: Effects on Hepatic Cytochrome P450 and Subacute Toxicity in Rats. *Thailand Journal Pharmaceutical and Science*. Vol. 30 : 8-18.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2001a. *OECD Guideline For Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity Fixed Dose Procedure No. 420*. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2001b. *OECD Guideline For Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity Acute Toxic Class Method No. 423*. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development.

- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2008. *OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure No. 425*. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development.
- Orfei, E. 2010. *Review of Pathology of the Liver*. <http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/orfpath/pthcntnt.htm>. [11 Januari 2016].
- Pithandikulam Forest. *Guazuma ulmifolia* Lam. <http://www.pitchandikulam-herbarium.org/contents/description-leaf.php?id=30>. [07 Desember 2015].
- Pradono, Julianto, Soemantri, dan Soeharsono. 2005. *Survei Kesehatan Nasional: Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT)*. Volume 3. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Prasetiawan, E., Sabri, E., dan Ilyas, S. 2012. Gambaran Histologis Hepar Mencit (*Mus musculus* L.) Strain DDW Setelah Pemberian Ekstrak N-Heksan Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* Dc.) Selama Masa Pra Implantasi dan Pasca Implantasi. *Saintia Biologi Jurnal Universitas Sumatera Utara*. Vol.1 (1): 1-6.
- Priyanto. 2010. *Toksikologi Mekanisme, Terapi Antidotum, dan Penilaian Resiko*. Cetakan 1. Jawa Barat: Lembaga Studi dan Konsultasi Farmakologi.
- Purnamasari, Y. 2014. *Ketoksikan Akut Oral Sediaan Uji Penurun Kolesterol Campuran Angkak dan Kayu Manis Pada Tikus Putih Jantan Galur Sprague Dawley*. Skripsi. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Rozqie, R. Diah, M., dan Rukmi, W. 2012. The Effect of Jati Belanda (*Guazuma Ulmifolia* Lamk) Leaves Extract on Histopathology of Rat's Kidney. *Tropical Medicine Journal*. Vol. 2 (1): 57-65.
- Sari, I. P., Nurrochmad, A., dan Setiawan, I. M. 2013. Indonesian Herbals Reduce Cholesterol Levels In Diet-Induced Hypercholesterolemia Through Lipase Inhibition. *Malaysian Journal Of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 11 (1): 13–20.
- Sari, K. L. O. R. 2006. Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol.3 (1): 01-07.

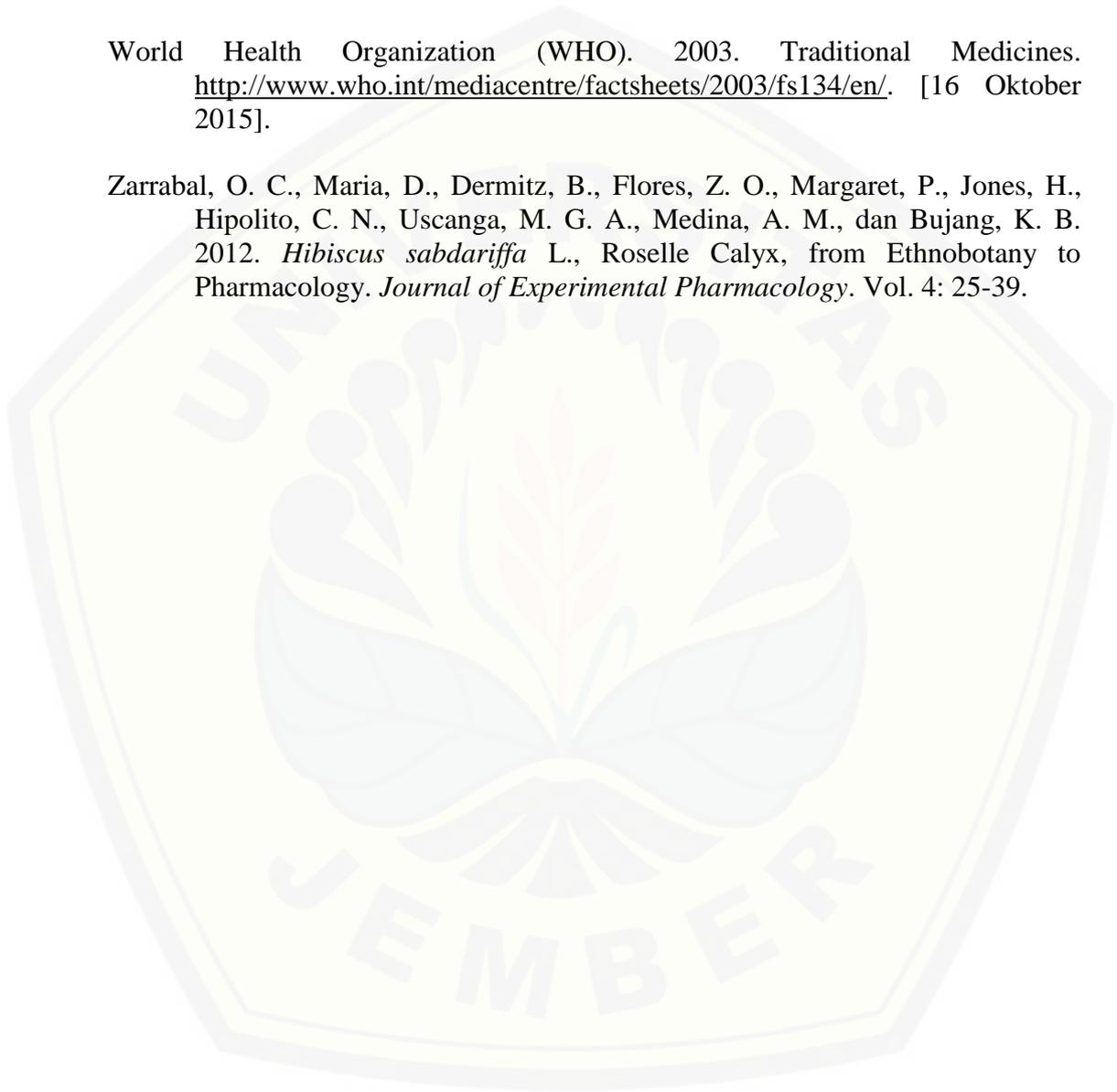
- Sari, P. A. M. 2016. *Ketoksikan Akut Kombinasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (Hibiscus sabdariffa L.) Dan Daun Jati Belanda (Guazuma ulmifolia Lamk.) Dengan Parameter Kadar SGOT dan SGPT Tikus Putih Jantan (Rattus norvegicus)*. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Sharma, M., Yashwant, dan Prasad, S. B. 2013. Hepatoprotective Activity of Guazoma Tomentosa Leaf Extracts Against CCl₄ Induced Liver Damage in Rats. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, Vol. 4 (4): 128-138.
- Sitzel, K., dan Carr, G. 1999. Statistical Basis for Estimating Acute Oral Toxicity Comparison of OECD Guidelines 401, 420, 423, and 425. *Up-and Down Procedure Peer Panel Report*.
- Staf Pengajar Departemen Farmakologi. 2004. *Kumpulan Kuliah Farmakologi*. Edisi 2. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Suharmiyati, dan Maryani, H. 2003. *Khasiat & Manfaat Jati Belanda: Sipelansing & Peluruh Kolesterol*. Yogyakarta: Agro Media Pustaka.
- Sukandar, E.Y., Elfahmi, Nurdewi, 2009. Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.) terhadap Kadar Lipid Darah pada Tikus Jantan. *Jurnal Kedokteran Maranatha*. Vol.8 (2): 102-112.
- Sukandar, E. Y., Nurdewi, dan Elfahmi. 2012. Antihypercholesterolemic Effect of Combinations of *Guazuma ulmifolia* Lamk. Leaves and *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. Rhizomes Extract in Wistar Rats. *International Journal of Pharmacology*. Vol.8 (4): 277-282.
- Toruan, P. L. 2007. *Fat-loss not Weight-Loss; Gemuk tapi Ramping*. Jakarta: Trans Media.
- Ukoha, U. U., Mbagwu, S. I., Ndukwe, G. U., dan Obiagboso, C. 2015. Histological and Biochemical Evaluation of the Kidney Following Chronic Consumption of *Hibiscus sabdariffa*. *Advance in Biology*. Vol.2015: 1-6.
- United Nations. 2011. *Globally Harmonized System Of Clasification and Labelling of Chemical (GHS)*. New York & Geneva: United Nations.
- Utomo, A. W., dan Wijayahadi, N. 2008. *Uji Toksisitas Akut Ekstrak Alkohol Daun Jati Belanda (Guazuma ulmifolia Lamk) pada Tikus Wistar*. Artikel Karya Tulis Ilmiah. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Wignjoesastro, C., Arieselia, Z., dan Dewi. 2014. Pengaruh Bawang Putih (*Allium sativum*) terhadap Pencegahan Hiperkolesterolemia pada Tikus. *Journal of Medicine*. Vol. 1 (1): 9-16.

Wijayakusuma, M. H. 2008. *Ramuan Herbal Penurun Kolesterol*. Jakarta: Pustaka Bunda.

World Health Organization (WHO). 2003. Traditional Medicines. [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs134/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/). [16 Oktober 2015].

Zarrabal, O. C., Maria, D., Dermitz, B., Flores, Z. O., Margaret, P., Jones, H., Hipolito, C. N., Uscanga, M. G. A., Medina, A. M., dan Bujang, K. B. 2012. *Hibiscus sabdariffa* L., Roselle Calyx, from Ethnobotany to Pharmacology. *Journal of Experimental Pharmacology*. Vol. 4: 25-39.



LAMPIRAN A. Surat Keterangan Identifikasi Tumbuhan

A.1 Surat Keterangan Identifikasi Jati Belanda



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN
KEBUN RAYA PURWODADI

LIPI

Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163
Telp. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046, Faks. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046
website: <http://www.krppurwodadi.lipi.go.id>



SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 1602/IPH.06/HM/XI/2015

Kepala UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi dengan ini menerangkan bahwa material tanaman yang dibawa oleh :

Nuri, S.Si., Apt., M.Si, NIM : 196904122001121007

Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember, datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 17 Nopember 2015, berdasarkan buku Flora of Java, karangan C.A. Backer dan R.C. Bakhuizen van den Brink jr., volume I, tahun 1963, halaman 408 dan PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 12 (2) ; Medicinal and poisonous plants 2, editor J.L.C.H van Valkenburg dan Bunyaphratsara, tahun 2002, halaman 286 nama ilmiahnya adalah :

Genus : *Guazuma*
Species : *Guazuma ulmifolia* Lmk.

Adapun menurut buku An Integrated System of Classification of Flowering plants, karangan Arthur Cronquist tahun 1981, halaman XIV adalah sebagai berikut :

Divisio : *Magnoliophyta*
Class : *Magnoliopsida*
Subclass : *Dilleniidae*
Ordo : *Malvales*
Family : *Sterculiaceae*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 23 Nopember 2015

An. Kepala
Kepala Seksi Konservasi Ex-situ,



Deden Mudiana, S.Hut, M.Si

A.2 Surat Keterangan Identifikasi Rosella



**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN
KEBUN RAYA PURWODADI**

Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163
Telp. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046, Faks. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046
website: <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>



SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. (65)IPH.06/HM/XI/2015

Kepala UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi dengan ini menerangkan bahwa material tanaman yang dibawa oleh :

Nuri, S.Si., Apt., M.Si. NIM : 196904122001121007

Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember, datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 17 Nopember 2015, berdasarkan buku Flora of Java, karangan C.A. Backer dan R.C. Bakhuizen van den Brink jr., volume I, tahun 1963, halaman 431 dan PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 12 (2) ; Medicinal and poisonous plants 2, editor J.L.C.H van Valkenburg dan Bunyaphratsara, tahun 2002, halaman 297 nama ilmiahnya adalah :

Genus : *Hibiscus*
Species : *Hibiscus sabdariffa* L.

Adapun menurut buku An Integrated System of Classification of Flowering plants, karangan Arthur Cronquist tahun 1981, halaman XVIII adalah sebagai berikut :

Divisio : *Magnoliophyta*
Class : *Magnoliopsida*
Subclass : *Dilleniidae*
Ordo : *Malvales*
Family : *Malvaceae*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 24 Nopember 2015
An. Kepala
Kepala UPT Balai Konservasi Ex-situ,



Deden Mudiana, S.Hut, M.Si

LAMPIRAN B. Hasil Rendemen Ekstrak**B.1 Ekstrak Etanol Daun Jati Belanda**

Berat simplisia daun jati belanda = 600,14 gram

Berat ekstrak daun jati belanda = 37,12 gram

$$\begin{aligned}\text{Rendemen ekstrak daun jati belanda} &= \frac{\text{berat ekstrak (gram)}}{\text{berat simplisia (gram)}} \times 100\% \\ &= \frac{37,12}{600,14} \times 100\% \\ &= 6,19 \%\end{aligned}$$

B.2 Ekstrak air kelopak bunga rosella

Berat simplisia kelopak bunga rosella = 300,06 gram

Berat ekstrak kelopak bunga rosella = 40,26 gram

$$\begin{aligned}\text{Rendemen ekstrak kelopak bunga rosella} &= \frac{\text{berat ekstrak (gram)}}{\text{berat simplisia (gram)}} \times 100\% \\ &= \frac{40,26}{300,06} \times 100\% \\ &= 13,42 \%\end{aligned}$$

LAMPIRAN C. Perhitungan Dosis Uji Ketoksikan Akut**C.1 Dosis 2.000 mg/kg BB Replikasi 1**

Misal berat badan tikus 150 gram.

$$\frac{2.000 \text{ mg}}{1.000 \text{ g}} = \frac{x}{150 \text{ g}}$$

$x = 300 \text{ mg}$ ekstrak (150 mg ekstrak etanol daun jati belanda + 150 mg ekstrak air kelopak bunga rosella).

Ekstrak tersebut diberikan dalam volume pemejanan 2 ml.

1.1 Kelompok Kontrol

Diberikan larutan CMC Na 0,5 % dan Tween 1%

a. Tikus ke-1 BB : 114,2 g

Volume yang diberikan :

$$\frac{2 \text{ ml}}{150 \text{ g}} = \frac{x}{114,2 \text{ g}}$$

$x = 1,5 \text{ ml}$

b. Tikus ke-2 BB : 104,8 g

Volume yang diberikan :

$$\frac{2 \text{ ml}}{150 \text{ g}} = \frac{x}{104,8 \text{ g}}$$

$x = 1,4 \text{ ml}$

c. Tikus ke-3 BB: 102,1 g

Volume yang diberikan :

$$\frac{2 \text{ ml}}{150 \text{ g}} = \frac{x}{102,1 \text{ g}}$$

$x = 1,3 \text{ ml}$

1.2 Kelompok Perlakuan Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Jati Belanda dan Ekstrak air kelopak bunga rosella

a. Tikus ke-1 BB : 130 g

Ekstrak yang diberikan :

$$\frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{130 \text{ g}}$$

$$x = 260 \text{ mg}$$

Volume sediaan yang diberikan :

$$\frac{300 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{260 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 1,7 \text{ ml}$$

b. Tikus ke-2 BB : 120,7 g

Ekstrak yang diberikan :

$$\frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{120,7 \text{ g}}$$

$$x = 241,4 \text{ mg}$$

Volume sediaan yang diberikan :

$$\frac{300 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{241,4 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 1,6 \text{ ml}$$

c. Tikus ke-3 BB : 112,5 g

Ekstrak yang diberikan :

$$\frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{112,5 \text{ g}}$$

$$x = 225 \text{ mg}$$

Volume sediaan yang diberikan :

$$\frac{300 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{225 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 1,5 \text{ ml}$$

C.2 Dosis 2.000 mg/kg BB Replikasi 2

2.1 Kelompok Perlakuan Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Jati Belanda dan Ekstrak air kelopak bunga rosella

a. Tikus ke-1 BB : 116 g

Ekstrak yang diberikan :

$$\frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{116 \text{ g}}$$

$$x = 232 \text{ mg}$$

Volume sediaan yang diberikan :

$$\frac{300 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{232 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 1,5 \text{ ml}$$

b. Tikus Ke-2 BB : 101,5 g

Ekstrak yang diberikan :

$$\frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{101,5 \text{ g}}$$

$$x = 203 \text{ mg}$$

Volume sediaan yang diberikan :

$$\frac{300 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{203 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 1,35 \text{ ml}$$

c. Tikus ke-3 BB : 107,5 g

Ekstrak yang diberikan :

$$\frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{107,5 \text{ g}}$$

$$x = 215 \text{ mg}$$

Volume sediaan yang diberikan :

$$\frac{300 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{215 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 1,4 \text{ ml}$$

C.3 Dosis 5.000 mg/kg BB

Misal berat badan tikus 150 gram.

$$\frac{5.000 \text{ mg}}{1.000 \text{ g}} = \frac{x}{150 \text{ g}}$$

$x = 750 \text{ mg}$ ekstrak (375 mg ekstrak etanol daun jati belanda + 375 mg ekstrak air kelopak bunga rosella).

Ekstrak tersebut diberikan dalam volume pemejanan 2 ml.

3.1 Kelompok Kontrol

Diberikan larutan CMC Na 0,5 % dan Tween 1%

a. Tikus ke-1 BB : 110 g

Volume yang diberikan :

$$\frac{2 \text{ ml}}{150 \text{ g}} = \frac{x}{110 \text{ g}}$$

$$x = 1,4 \text{ ml}$$

b. Tikus ke-2 BB : 100,5 g

Volume yang diberikan :

$$\frac{2 \text{ ml}}{150 \text{ g}} = \frac{x}{100,5 \text{ g}}$$

$$x = 1,3 \text{ ml}$$

c. Tikus ke-3 BB : 100,5 g

Volume yang diberikan :

$$\frac{2 \text{ ml}}{150 \text{ g}} = \frac{x}{100,5 \text{ g}}$$

$$x = 1,3 \text{ ml}$$

3.2 Kelompok Perlakuan Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Jati Belanda dan Ekstrak air kelopak bunga rosella

a. Tikus ke-1 BB : 122,7 g

Ekstrak yang diberikan :

$$\frac{5000 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = \frac{x}{122,7 \text{ g}}$$

$$x = 613,5 \text{ mg}$$

Volume sediaan yang diberikan :

$$\frac{750 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = \frac{613,5 \text{ mg}}{x}$$

$$x = 1,6 \text{ ml}$$

b. Tikus ke-2 BB : 113 g

Ekstrak yang diberikan :

$$\frac{5000\text{mg}}{1000\text{ g}} = \frac{x}{113\text{ g}}$$

$$x = 565\text{ mg}$$

Volume sediaan yang diberikan :

$$\frac{750\text{mg}}{2\text{ ml}} = \frac{565\text{ mg}}{x}$$

$$x = 1,5\text{ ml}$$

c. Tikus ke-3 BB : 105,5 g

Ekstrak yang diberikan :

$$\frac{5000\text{mg}}{1000\text{ g}} = \frac{x}{105,5\text{ g}}$$

$$x = 527,5\text{ mg}$$

Volume sediaan yang diberikan :

$$\frac{750\text{ mg}}{2\text{ ml}} = \frac{527,5\text{ mg}}{x}$$

$$x = 1,4\text{ ml}$$

LAMPIRAN D. Perhitungan Purata Perubahan Berat Badan per Hari Hewan Uji

$$\text{Purata perubahan BB per hari} = \frac{(\text{BB hari terakhir} - \text{BB hari pertama}) \text{ gram}}{\text{banyak hari pengamatan}}$$

D1. Purata Perubahan Berat Badan per Hari Kelompok Kontrol Normal

1. Hewan uji 1

$$\text{Purata perubahan BB per hari} = \frac{156 \text{ g} - 110 \text{ g}}{14} = 3,28$$

2. Hewan uji 2

$$\text{Purata perubahan BB per hari} = \frac{115,6 \text{ g} - 100,5 \text{ g}}{14} = 1,08$$

3. Hewan uji 3

$$\text{Purata perubahan BB per hari} = \frac{133 \text{ g} - 100,5 \text{ g}}{14} = 2,32$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{3,28 + 1,08 + 2,32}{3} = 2,23$$

D2. Purata Perubahan Berat Badan per Hari Kelompok Perlakuan Dosis 5.000 mg/kg BB

1. Hewan uji 1

$$\text{Purata perubahan BB per hari} = \frac{185,5 \text{ g} - 122,7 \text{ g}}{14} = 4,48$$

2. Hewan uji 2

$$\text{Purata perubahan BB per hari} = \frac{165,5 \text{ g} - 113 \text{ g}}{14} = 3,75$$

3. Hewan uji 3

$$\text{Purata perubahan BB per hari} = \frac{170,2 \text{ g} - 105,5 \text{ g}}{14} = 4,62$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{4,48 + 3,75 + 4,62}{3} = 4,28$$

LAMPIRAN E. Hasil Pemeriksaan Histopatologi Organ Hati, Ginjal, dan Jantung Hewan Uji



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
LABORATORIUM PATOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA**
Jl. Fauna, Karangmalang, Yogyakarta 55281, Tlp. (0274) 9061103, 560862 Fax. 560861

No : 030/PA/I/2016 Yogyakarta, 7 Maret 2016
 Hal : Hasil Histopatologi
 No. Protokol :-
 Lampiran :-

Yth. Sdr. Nuri
 Di Fakultas Farmasi
 Univesitas Negeri Jember

Berikut disampaikan hasil pembacaan preparat histopatologi berupa organ ginjal, jantung, lambung, hepar dan lien tikus dengan pengecatan hematoxilin dan eosin.

Kode	Ginjal	Jantung	Lambung	Hepar	Lien
20001/111	Glomerulus hepertropi, Protein leaking dan kongesti	Tap	Tap	Multifokal nekrosis krn infeksi	Kongesti
20001/112				Apoptosis	Extramedular haemopoiesis
20001/131	Vakuolisasi epitel tubulus / sedikit	Tap	Tap	Infiltrasi Glikogen	Deplesi limfosit di pulpa putih
20001/132	Glomerulus hepertropi, Protein leaking dan kongesti	Tap	Tap	Infeksi	Kongesti
20001/133	Vakuolisasi dan Nekrosis epitel tubulus	Tap	Tap	Infiltrasi Glikogen	Kongesti
20001/311	Vakuolisasi dan Nekrosis epitel tubulus	Tap	Tap	Tap	Deplesi limfosit di pulpa putih
20001/312	Glomerulus hepertropi, Protein leaking dan kongesti	Tap	Infiltrasi eosinofil di sub mukosa	Tap	Kongesti
20001/313	Vakuolisasi epitel tubulus	Tap	Tap	Tap	Tap
20001/K1	Tap	Tap	Tap	Tap	Kongesti
20001/K2	Tap	Tap	Tap	Tap	Deplesi limfosit di pulpa putih
20001/K3	Tap	Tap	Tap	Tap	Tap
20002/111	Vakuolisasi dan Nekrosis epitel tubulus	Tap	Tap	Bridging Degenerasi hidropik	Kongesti
20002/112	Glomerulus	Tap	Hiperkeratosis	Trombosis	Tap

	hepertropi, Protein leaking dan kongesti		Di mukosa cardia		
20002/113	Vakuolisasi epitel tubulus	Tap	Tap	infeksi	Deplesi limfosit di pulpa putih
20002/311	Glomerulus hepertropi, Protein leaking dan kongesti	Tap	Tap	Tap	Kongesti
20002/312	Glomerulus hepertropi, Protein leaking dan kongesti	Tap	Tap	Tap	Tap
20002/313	Vakuolisasi epitel tubulus	Tap	Tap	Degenerasi melemap	Tap
20002/131	Glomerulus hepertropi, Protein leaking dan Vakuolisasi epitel tubulus	Tap	Tap	Infeksi	Kongesti
20002/132	Glomerulus hepertropi, Protein leaking dan kongesti	Tap	Infiltrasi eosinofil di sub mukosa	Apoptosis sel hepar di sekitar vena sentralis	Kongesti
20002/133	Glomerulus hepertropi, Protein leaking dan kongesti	Tap	Tap	Infeksi	Deplesi limfosit di pulpa putih
5000/111	Glomerulus hepertropi, Protein leaking dan Vakuolisasi &Nekrosis epitel tubulus	Tap	Tap	Tap	Proleferasi limfosit sampai di pulpa merah
5000/112	Glomerulus hepertropi, Protein leaking dan kongesti	Tap	Tap	Bridging degenerasi hidropik	Kongesti
5000/113	Glomerulus hepertropi, Protein leaking dan Vakuolisasi &Nekrosis epitel tubulus	Tap	Tap	Tap	Tap
5000/131	Glomerulus hepertropi, Protein leaking dan Vakuolisasi &Nekrosis epitel tubulus	Tap	Tap	Tap	Kongesti

5000/132	Vakuolisasi epitel tubulus	Tap	Tap	Degenerasi melelemak	Kongesti
5000/133	Tap	Tap	Lapisan epitelial menebal	Tap	Kongesti
5000/311	Tap	Tap	Tap	Tap	Kongesti
5000/312	Vakuolisasi epitel tubulus	Tap	Tap	Tap	Deplesi limfosit di pulpa putih
5000/313	Vakuolisasi epitel tubulus	Tap	Tap	Tap	Tap
5000/K1	Tap	Tap	Tap	Degenerasi melelemak	Tap
5000/K2	Tap	Tap	Tap	infeksi	Tap
5000/K3	Tap	Tap	Tap	infeksi	Deplesi limfosit di pulpa putih

Keterangan :

Tap : tidak ada perubahan

Infeksi : ada dugaan perubahan bukan karena perlakuan tetapi lebih pada infeksi viral

Deplesi limfosit di pulpa putih karena kemungkinan ada infeksi viral

Demikian hasil yang bisa kami sampaikan, atas kerjasamanya kami ucapkan terima kasih

Ketua Departemen Patologi

[Signature]
 Drh. Sitarina Widyarini, MP., Ph.D.
 NIP. 196609161992032001.

LAMPIRAN F. Analisis Data Uji Normalitas**F.1 Data Perubahan Berat Badan per Hari Hewan Uji****Tests of Normality**

	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
perubahanBB	Kontrol	.200	3	.	.995	3	.860
	Dosis 5.000	.330	3	.	.867	3	.287

a. Lilliefors Significance Correction

$p > 0,05$ sehingga dapat dianalisis parametrik menggunakan uji-T tidak berpasangan

F.2 Data Berat Organ Hati Hewan Uji**Tests of Normality**

	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Berat hati	Kontrol	.246	3	.	.970	3	.668
	Dosis 5.000	.182	3	.	.999	3	.937

a. Lilliefors Significance Correction

$p > 0,05$ sehingga dapat dianalisis parametrik menggunakan uji-T tidak berpasangan

F.3 Data Berat Organ Ginjal Hewan Uji**Tests of Normality**

	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Beratginjal	Kontrol	.240	3	.	.975	3	.694
	Dosis 5.000	.327	3	.	.872	3	.300

a. Lilliefors Significance Correction

$p > 0,05$ sehingga dapat dianalisis parametrik menggunakan uji-T tidak berpasangan

F.4 Data Berat Organ Jantung Hewan Uji**Tests of Normality**

	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Berat jantung	Kontrol	.187	3	.	.998	3	.914
	Dosis 5.000	.264	3	.	.954	3	.587

a. Lilliefors Significance Correction

$p > 0,05$ sehingga dapat dianalisis parametrik menggunakan uji-T tidak berpasangan

LAMPIRAN G. Analisis Data Uji Homogenitas dan Uji-T Tidak Berpasangan

G.1 Data Perubahan Berat Badan Per Hari Hewan Uji

Group Statistics

	Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Perubahan BB	Kontrol	3	2.2267	1.10297	.63680
	Dosis 5.000	3	4.2833	.46715	.26971

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
PerubahanBB	Equal variances assumed	1.361	.308	-2.974	4	.041	-2.05667	.69156	-3.97675	-.13659
	Equal variances not assumed			-2.974	2.695	.067	-2.05667	.69156	-4.40526	.29192

Hasil uji Levene menunjukkan nilai $p > 0,05$ (data homogen) sehingga signifikansi uji-T tidak berpasangan yang dilihat adalah baris pertama (*Equal variances assumed*) dan menunjukkan nilai $p < 0,05$ yang artinya terdapat perbedaan bermakna pada data purata perubahan berat badan per hari hewan uji kelompok kontrol normal dan perlakuan.

G.2 Data Berat Organ Hati Hewan Uji

Group Statistics

Berat hati	Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
	Kontrol	3	6.126800	1.1107351	.6412832
	Dosis 5.000	3	7.238467	.2631935	.1519548

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
										Lower	Upper
Berat hati	Equal variances assumed	4.074	.114	-1.687	4	.167	-1.1116667	.6590405	-2.9414565	.7181232	
	Equal variances not assumed			-1.687	2.224	.221	-1.1116667	.6590405	-3.6905515	1.4672181	

Hasil uji Levene menunjukkan nilai $p > 0,05$ (data homogen) sehingga signifikansi uji-T tidak berpasangan yang dilihat adalah baris pertama (*Equal variances assumed*) dan menunjukkan nilai $p > 0,05$ yang artinya tidak terdapat perbedaan bermakna pada data berat organ hati hewan uji kelompok kontrol normal dan perlakuan.

G.3 Data Berat Organ Ginjal Hewan Uji

Group Statistics

	Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Berat ginjal	Kontrol	3	1.069067	.1123350	.0648566
	Dosis 5.000	3	1.460133	.0997237	.0575755

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Berat ginjal	Equal variances assumed	.018	.899	-4.509	4	.011	-.3910667	.0867255	-.6318554	-.1502780
	Equal variances not assumed			-4.509	3.945	.011	-.3910667	.0867255	-.6331952	-.1489381

Hasil uji Levene menunjukkan nilai $p > 0,05$ (data homogen) sehingga signifikansi uji-T tidak berpasangan yang dilihat adalah baris pertama (*Equal variances assumed*) dan menunjukkan nilai $p < 0,05$ yang artinya terdapat perbedaan bermakna pada data berat organ ginjal hewan uji kelompok kontrol normal dan perlakuan.

G.4 Data Berat Organ Jantung Hewan Uji

Group Statistics

	Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Berat jantung	Kontrol	3	.526100	.0831334	.0479971
	Dosis 5.000	3	.671233	.0393143	.0226981

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Berat jantung	Equal variances assumed	.989	.376	-2.734	4	.052	-.1451333	.0530936	-.2925447	.0022781
	Equal variances not assumed			-2.734	2.852	.076	-.1451333	.0530936	-.3191730	.0289063

Hasil uji Levene menunjukkan nilai $p > 0,05$ (data homogen) sehingga signifikansi uji-T tidak berpasangan yang dilihat adalah baris pertama (*Equal variances assumed*) dan menunjukkan nilai $p > 0,05$ yang artinya tidak terdapat perbedaan bermakna pada data berat organ jantung hewan uji kelompok kontrol normal dan perlakuan.

