



**EFEK TOKSISITAS EKSTRAK DAUN SINGKONG  
(*MANIHOT ESCULENTA*) TERHADAP GINJAL  
TIKUS DILIHAT DARI KADAR  
*BLOOD UREA NITROGEN*  
(BUN)**

**SKRIPSI**

Oleh:

**I Nyoman Kurniawan Agratama  
NIM 142010101065**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**



**EFEK TOKSISITAS EKSTRAK DAUN SINGKONG  
(*MANIHOT ESCULENTA*) TERHADAP GINJAL  
TIKUS DILIHAT DARI KADAR  
*BLOOD UREA NITROGEN*  
(BUN)**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S-1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh:

**I Nyoman Kurniawan Agratama  
NIM 142010101065**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**

### **PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ida Sang Hyang Widhi Wasa atas anugerah yang telah diberikan kepada saya;
2. Ayahanda I Komang Susanta dan juga ibunda Supartiningsih yang telah memberikan doanya, dukungan, pengorbanan, kasih sayang dan didikannya kepada saya;
3. Kakak kandung Ni Wayan Sonia Pradipta Rahayu dan I Made Irawan Hendra Gunawan yang selalu mendukung perjalanan kuliah saya;
4. Guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi;
5. dr. Rena Normasari, M.Biomed. dan dr. Enny Suswati, M.Kes. yang sudah banyak membantu dalam memberikan motivasi baik moril dan materil dalam penelitian saya;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

**MOTO**

To infinity and beyond.

(Buzz Lightyear)



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : I Nyoman Kurniawan Agratama

NIM : 142010101065

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Toksisitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) terhadap Ginjal Tikus Dilihat dari Kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN)”. adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali dalam pengutipan substansi yang sudah disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 8 Januari 2018

Yang menyatakan,

I Nyoman Kurniawan Agratama

NIM.142010101065

**SKRIPSI**

**EFEK TOKSISITAS EKSTRAK DAUN SINGKONG  
(*MANIHOT ESCULENTA*) TERHADAP GINJAL  
TIKUS DILIHAT DARI KADAR  
*BLOOD UREA NITROGEN*  
(BUN)**

Oleh:

I Nyoman Kurniawan Agratama

NIM 142010101065

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Rena Normasari, M.Biomed

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Enny Suswati, M.Kes

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Efek Toksisitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) terhadap Ginjal Tikus Dilihat dari Kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN)” karya I Nyoman Kurniawan Agratama telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Senin, 8 Januari 2018

Tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

**Tim Penguji**

Ketua,

dr. Rini Riyanti, Sp.PK.  
NIP 197203281999032001

Anggota II,

dr. Rena Normasari, M.Biomed.  
NIP 198305122008122002

Anggota I,

dr. Erfan Efendi, Sp.An.  
NIP 196803281999031001

Anggota III

dr. Enny Suswati, M.Kes.  
NIP 197002141999032001

Mengesahkan  
Dekan,

dr. Enny Suswati, M.Kes.  
NIP 197002141999032001

## RINGKASAN

**Uji Toksisitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) terhadap Ginjal Tikus Dilihat dari Kadar Blood Urea Nitrogen (BUN);** I Nyoman Kurniawan Agratama; NIM 142010101065; 2018; 45 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Pada umumnya singkong banyak dikonsumsi sebagai pengganti nasi dan juga sebagai sayuran. Pada era *modern* seperti sekarang, konsumsi singkong mulai ditinggalkan karena masyarakat lebih memilih tanaman padi sebagai makanan pokok setiap harinya. Tetapi, konsumsi daun singkong makin populer dikarenakan bisa diolah dalam berbagai macam masakan. Daun singkong banyak dikonsumsi karena murah dan mudah didapat, selain itu daun singkong memiliki banyak manfaat dibidang kesehatan karena memiliki kandungan flavonoid, triterpenoid, saponin, tannin, dan vitamin C (Nurdiana, 2013). Selain kandungan flavonoid yang baik untuk kesehatan, singkong juga mengandung beberapa zat sianogenik yang dapat memperburuk kondisi organ, seperti linamarin (>90%) dan lotaustralin (<10%) dengan kandungan terbesar terdapat pada daun singkong sebesar 5g linamarin dalam 1kg daun singkoang (Wanda *et al.*, 1998).

Zat sianogenik atau efek toksik pada daun singkong dapat menyebabkan gangguan pada beberapa organ. Salah satu organ target dari ketoksisitasan adalah ginjal. Menurut Nuridayanti (2011) ginjal menjadi organ sasaran dikarenakan perannya dalam mengkonsentrasikan toksikan pada filtrat, membawa toksikan melalui tubulus, dan mengaktifkan toksikan tertentu, sehingga dapat menimbulkan efek toksikan yang ditunjukkan dengan perubahan biokimia sampai dengan kematian sel, yang umumnya muncul sebagai perubahan fisiologis ginjal sampai dengan gagal ginjal. Salah satu penilaian fisiologis ginjal adalah pemeriksaan BUN atau ureum yang berfungsi untuk mengukur secara kasar fungsi ginjal (Sherwood, 2013).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh toksistas akut ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) yang diberikan per oral pada mencit dengan melihat kadar BUN. Penelitian ini merupakan penelitian kuasi

eksperimental dengan post test–only control group design. Sampel penelitian dibagi menjadi 2, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, dimana setiap kelompok berisi 5 ekor tikus. Pemberian perlakuan di dahului dengan uji pendahuluan. Uji pendahuluan bertujuan untuk mengetahui besaran dosis yang akan digunakan. Dosis yang di berikan sebanyak 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg. Setelah dilakukan uji pendahuluan selama 14 hari dan telah di dapatkan dosis pasti, maka dilanjutkan dengan uji utama selama 14 hari. Jika selama uji utama ada tikus yang mati, maka akan segera di ambil darahnya untuk di ukur kadar BUN. Pada penelitian ini tikus pendahuluan diberi dosis 2000 mg/kgBB dan didapatkan hasil tikus masih hidup, sehinga dosis 2000 mg/kgBB digunakan pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol diberi Na CMC.

Hasil dari penelitian ini didapatkan nilai rata-rata kadar BUN pada kelompok kontrol sebesar 42,3 mg/dL dan kelompok perlakuan sebesar 51,94 mg/dL. Lalu data dimasukan ke dalam *spss* dan didapatkan hasil ( $P>0,5$ ). Peningkatan kadar BUN dapat dipengaruhi oleh beberapa hal, yaitu diet tinggi protein dan keadaan dehidrasi, sehingga pada penelitian ini didapatkan dosis toksik ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) tidak menyebabkan peningkatan yang bermakna terhadap kadar BUN pada kelompok perlakuan yang diinduksi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*).

## PRAKATA

Puji syukur dihadapan Ida Sang Hyang Widhi Wasa atas segala anugerah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Toksisitas Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) terhadap Ginjal Tikus Dilihat dari *Kadar Blood Urea Nitrogen* (BUN)”. Skripsi ini disusun untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusun skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan selaku dosen pembimbing II saya;
2. dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing saya selama belajar di Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
3. dr. Rena Normasari, M.Biomed. selaku Dosen Pembimbing I yang telah membantu penulisan skripsi ini sejak awal hingga akhir.
4. dr. Rini Riyanti, Sp.PK dan dr. Erfan Efendi, Sp.An selaku Dosen Penguji yang telah memberikan masukan yang bermanfaat untuk menyelesaikan penulisan skripsi ini.
5. Bapak, Ibu, dan Saudara tercinta yang sudah memberikan banyak doa, kasih sayang, dan motivasi untuk menyelesaikan penulisan ini;
6. Analis dan civitas Fakultas Kedokteran Universitas Jember
7. Keluarga besar BEM FK UNEJ, SRCR, UKM-O, dan ELIXIR yang sudah mewarnai semua hari-hari saya selama menjadi mahasiswa;
8. Ayu Candrayuni yang telah memberikan doa, kasih sayang, dukungan, dan motivasi untuk tidak mudah menyerah
9. Sahabat-sahabat saya, Alex Sheilavi dan Akbar Maulida Arisadewa yang telah menjadi rekan kerja terbaik dan memberi semangat selama penelitian

10. Sahabat-sahabat saya, Azka Darajat, Ferdian Nugroho, Sri Weli, , Ahmad Ma'aruf, Syahrian, Bagus Aditnya, Ahmad Baihaqi dan Samuel Sampe yang sudah banyak memberikan dukungannya dan motivasinya untuk segera menyelesaikan penelitian ini;
10. Teman-teman kost dartono dan kolonk yang sudah memberikan semangatnya dalam menyelesaikan tulisan ini;
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

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

Jember, 8 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

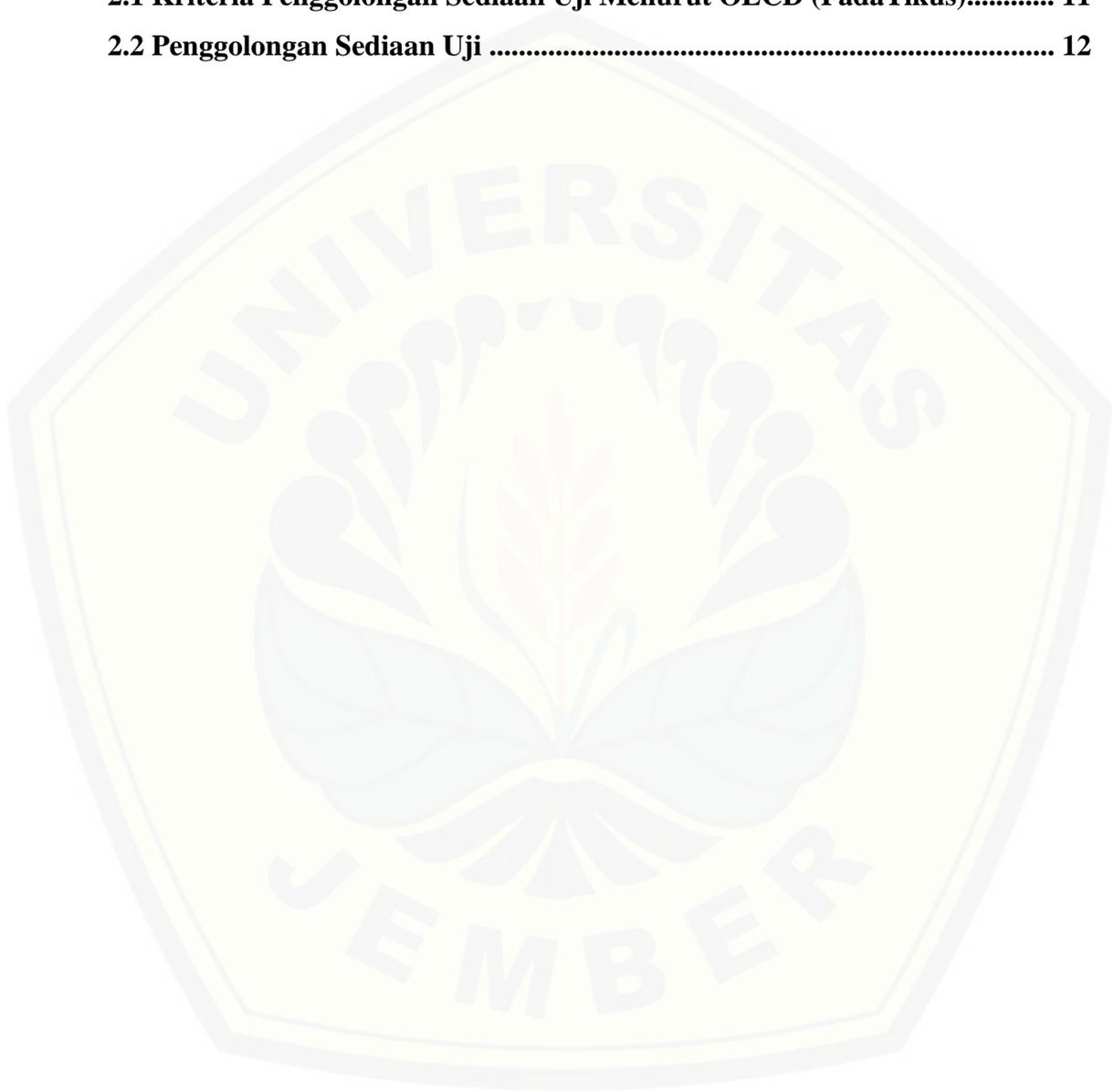
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN SAMPUL.....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTO.....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN BIMBINGAN.....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN .....</b>	<b>xviii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Singkong (<i>Manihot esculenta</i>) .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Klasifikasi.....	4
2.1.2 Morfologi .....	5
2.1.3 Kandungan Kimia .....	5

2.1.4 Khasiat.....	5
<b>2.2 Asam Sianida .....</b>	<b>6</b>
2.2.1 Sianogenesis pada daun singkong .....	6
2.2.2 Absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi glikosida sianogenik .....	7
2.2.3 Patomekanisme gangguan ginjal akibat glikosida sianogenik.....	8
<b>2.3 Uji Toksisitas .....</b>	<b>9</b>
2.3.1 Uji Toksisitas Akut.....	10
2.3.2 Kriteria Penggolongan Sediaan Uji Menurut OECD (2001).....	11
<b>2.4 Anatomi dan Fisiologi Ginjal .....</b>	<b>12</b>
<b>2.5 Pemeriksaan <i>Blood Urea Nitrogen</i> (BUN) .....</b>	<b>14</b>
2.5.1 Metabolisme <i>Blood Urea Nitrogen</i> (BUN).....	14
2.5.2 Pengukuran <i>Kadar Blood Urea Nitrogen</i> (BUN) .....	16
<b>2.6 Kerangka Konseptual .....</b>	<b>16</b>
<b>2.7 Hipotesis .....</b>	<b>18</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Klasifikasi dan Definisi Operasional Variabel .....</b>	<b>20</b>
3.2.1 Klasifikasi variabel.....	20
3.2.2 Definisi operasional variabel.....	21
<b>3.3 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4 Alat dan Bahan Penelitian .....</b>	<b>22</b>
3.4.1 Alat .....	22
3.4.2 Bahan Penelitian .....	22
3.4.3 Bahan Uji .....	22
3.4.4 Hewan Coba.....	22
<b>3.5 Prosedur Penelitian.....</b>	<b>23</b>
3.5.1 Penyediaan Ekstrak Daun Singkong ( <i>Manihot Esculenta</i> ).....	23
3.5.2 Aklimitasi .....	24
3.5.3 Tahap Perlakuan .....	24

3.5.4 Pengambilan Darah Intrakardial .....	26
3.5.5 Pengukuran Kadar <i>Blood Urea Nitrogen</i> (BUN) .....	26
<b>3.6 Analisis Data .....</b>	<b>27</b>
<b>3.7 Alur Penelitian.....</b>	<b>28</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Hasil Penelitian.....</b>	<b>29</b>
4.1.1 Hasil Pemeriksaan Kadar <i>Blood Urea Nitrogen</i> (BUN) .....	29
<b>4.2 Analisis Data <i>Blood Urea Nitrogen</i> (BUN) .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Pembahasan .....</b>	<b>30</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>33</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>34</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
<b>2.1 Kriteria Penggolongan Sediaan Uji Menurut OECD (Pada Tikus).....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Penggolongan Sediaan Uji .....</b>	<b>12</b>



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
<b>2.1 Singkong.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Sianogenesis Linamarin .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi Glikosida Sianogenik.....</b>	<b>7</b>
<b>2.4 Anatomi Ginjal.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 Kerangka Konseptual.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Skema Pemberian Uji Pendahuluan .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Alur Penelitian.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Grafik Rata-Rata Kadar BUN.....</b>	<b>29</b>

DAFTAR LAMPIRAN

<b>3.1 Persetujuan Etik Peneliti.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Hasil Uji Determinasi.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Tabel Pemberian Dosis 2000 mg/kgBB Ekstrak Daun Singkong .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3 Hasil Penghitungan Kadar BUN .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4 Analisis Data Kadar BUN .....</b>	<b>43</b>
4.4.1 Uji Normalitas .....	43
4.4.2 Uji Homogenitas .....	43
4.4.3 Uji <i>T test</i> .....	43
<b>4.5 Gambar Penelitian .....</b>	<b>44</b>
4.5.1 Pembuatan Ekstrak Daun Singkong .....	44
4.5.2 Pembuatan Sediaan Oral Ekstrak Daun Singkong .....	44
4.5.3 Induksi Oral Ekstrak Daun Singkong dan Pengamatan .....	44
4.5.4 Terminasi dan Pengambilan Darah Intrakardial.....	45
4.5.5 Pemeriksaan Kadar BUN .....	45

**DAFTAR SINGKATAN**

ATP : *adenosin trisfosfat*

BUN : *Blood Urea Nitrogen*

COX : *cyclo-oxygebase*

HCN : Asam sianida

MDA : *malone dialdehyde*

NO : Nitrogen Monoksida

PKC : Fosfokinase C

PLA2 : Fosfolipase A2

ROS : *Reactive Oxygen Sp*



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Wilayah Indonesia terdapat sekitar 30.000 jenis tumbuhan dan 7.000 di antaranya diketahui memiliki khasiat sebagai obat. Sebanyak 2500 jenis diantaranya merupakan tanaman obat (Kementrian Perdagangan, 2014). Salah satu tanaman yang terdapat di Indonesia adalah singkong (*Manihot esculenta*). Singkong termasuk kedalam familia *Euphorbiaceae* yang mudah tumbuh di tanah kering dan juga rentan dari serangan penyakit. Pada umumnya singkong banyak dikonsumsi sebagai pengganti nasi dan juga sebagai sayuran. Pada era *modern* seperti sekarang, konsumsi singkong mulai ditinggalkan karena masyarakat lebih memilih tanaman padi sebagai makanan pokok setiap harinya. Tetapi, konsumsi daun singkong makin populer dikarenakan dapat diolah menjadi berbagai macam masakan. Daun singkong banyak dikonsumsi karena murah dan mudah didapat, selain itu daun singkong memiliki banyak manfaat dibidang kesehatan karena memiliki kandungan flavonoid, triterpenoid, saponin, tannin, dan vitamin C (Nurdiana, 2013). Menurut hasil penelitian, daun singkong merupakan jenis sayuran yang banyak mengandung flavonoid. Kandungan utama flavonoid daun singkong adalah senyawa rutin ( $C_{27}H_{30}O_{16}$ ) yang merupakan glikosida kuersetin dengan disakarida yang terdiri dari glukosa dan shamnosa (Sukrasno *et al.*, 2007). Selain itu menurut penelitian yang dilakukan Warditiani *et al* (2015), ekstrak daun singkong memiliki efek antihiperqlikemi yang didapat dari kandungan flavonoid. Selain kandungan flavonoid yang baik untuk kesehatan, singkong juga mengandung beberapa zat glikosida sianogenik yang dapat memperburuk kondisi organ, seperti asam sianida atau HCN yang berasal dari linamarin (>90%) dan lotaustralin (<10%) dengan kandungan terbesar terdapat pada daun singkong sebesar 5 g linamarin dalam 1kg daun singkong (Wanda *et al.*, 1998).

Zat sianogenik atau efek toksik pada daun singkong dapat menyebabkan gangguan pada beberapa organ. Salah satu organ target dari ketoksitasan adalah ginjal. Menurut Nuridayanti (2011) ginjal menjadi organ sasaran dikarenakan peranannya dalam mengkonsentrasikan toksikan pada filtrat, membawa toksikan melalui tubulus, dan mengaktifkan toksikan tertentu, sehingga dapat menimbulkan efek toksikan yang ditunjukkan dengan perubahan biokimia sampai dengan kematian sel, yang umumnya muncul sebagai perubahan fisiologis ginjal sampai dengan gagal ginjal. Salah satu penilaian fisiologis ginjal adalah pemeriksaan *blood urea nitrogen* (BUN) atau ureum yang berfungsi untuk mengukur secara kasar fungsi ginjal (Sherwood, 2013).

Jumlah konsumsi daun singkong yang banyak dikhawatirkan akan berdampak buruk bagi manusia, sehingga perlu dilakukan uji untuk mengetahui batasan konsumsi daun singkong yang aman bagi tubuh. Hal itu dapat diketahui melalui uji toksisitas. Uji toksisitas adalah suatu uji yang digunakan untuk mendeteksi efek toksis suatu zat yang dihasilkan dari tanaman. Uji toksisitas terdiri atas 2 jenis, yaitu: uji toksistas umum (akut, sub akut, kronis) dan uji toksisitas khusus (teratogenik, mutagenic, dan karsinogenik) (BPOM, 2014). Dalam rangka pengembangan pemanfaatan daun singkong (*Manihot esculenta*) sebagai obat dan untuk menguji seberapa bahayanya konsumsi daun singkong karena mengandung glukosida sianogenik, maka perlu dilakukan penelitian mengenai efikasi dan keamanannya. Uji toksisitas ini merupakan salah satu bagian dari rangkaian studi terhadap daun singkong (*Manihot esculenta*) yang juga meliputi evaluasi senyawa bioaktif dan studi preklinik sebagai antihiperqlikemi. Uji toksisitas bahan obat pada tahap preklinik meliputi uji toksistas umum dengan dosis tunggal (akut). Oleh karena itu, penelitian ini akan mempelajari efek toksis yang ditimbulkan pada penggunaan ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) dengan melihat kadar BUN pada ginjal tikus putih.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) dosis toksik dapat menyebabkan kenaikan kadar *blood urea nitrogen* (BUN)?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui pengaruh toksisitas akut ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) yang diberikan per oral pada tikus dengan melihat kadar *blood urea nitrogen* (BUN).

## 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas akut pemberian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) terhadap ginjal tikus dan memperkirakan resiko penggunaan ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) pada manusia, sehingga nantinya penggunaan ekstrak tersebut dapat dilakukan secara aman. Selain itu juga sebagai landasan bagi pengembangan lebih lanjut daun singkong (*Manihot esculenta*) sebagai bahan obat yang dapat memperkaya khasanah bahan obat alam Indonesia.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Singkong (*Manihot esculenta*)

#### 2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi singkong (*Manihot esculenta*) menurut Soelistijono (2006) dapat dijelaskan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malpighiales
Famili	: Euphorbiaceae
Subfamili	: Crontonoidae
Bangsa	: Manihoteae
Genus	: Manihot
Spesies	: <i>M. esculenta</i>



Gambar 2.1 Singkong

### 2.1.2 Morfologi

Singkong atau *Manihot esculenta* merupakan tanaman dikotil yang banyak ditemukan di berbagai daerah. Tinggi tanaman bisa mencapai 3 meter lebih. Warna batang bervariasi, tapi pada umumnya berwarna hijau dan setelah tua berwarna keputihan, kelabu, hijau kelabu atau coklat kelabu. Daun ubi kayu mempunyai susunan berurat menjari dengan canggap 5-9 helai. Ubi yang terbentuk di akar memiliki bentuk bulat memanjang (Rukmana, 1997)

### 2.1.3 Kandungan kimia

Daun singkong memiliki beberapa kandungan yang baik bagi tubuh, yaitu flavonoid, triterpenoid, saponin, tannin dan vitamin c (Nurdiana *et al.*, 2013) serta memiliki kandungan protein yang cukup tinggi, berkisar antara 20 – 36 %, lemak 9,41 %, serat kasar 19,06 %, calcium 1,91 % dan fosfor 0,46 % (Askar, 1996). Kandungan vitamin dalam daun singkong sangat tinggi terutama pada daun muda yang biasa dikonsumsi manusia. Vitamin yang paling penting dalam daun singkong antara lain asam askorbat, tiamin, riboflavin, dan niasin (Awoyinka *et al.*, 1995). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nhu Phuc *et al.* (2000), daun singkong dari enam varian yang diambil di Vietnam, India, dan Jepang kaya akan kandungan asam askorbat, tiamin, dan  $\beta$ -karoten. Selain senyawa yang baik untuk tubuh, daun singkong juga memiliki kandungan berbahaya bersifat sianogenik atau memiliki kandungan HCN yang berasal dari linamarin dan lotaustralin.

### 2.1.4 Khasiat

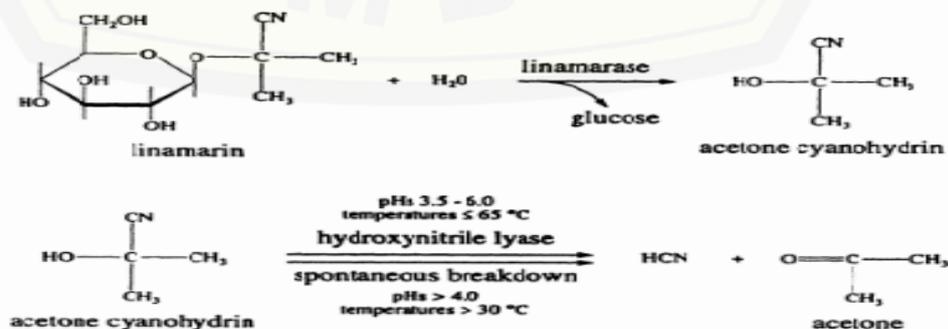
Secara umum, daun singkong banyak di konsumsi karena jumlah protein yang tinggi sehingga menyehatkan bagi tubuh. Daun singkong juga banyak digunakan sebagai bahan penelitian untuk kesehatan, seperti penelitian yang dilakukan Normasari *et al* (2017) yang memanfaatkan daun singkong untuk perbaikan struktur dan fungsi ginjal, serta penelitian yang dilakukan oleh

Warditiani *et al* (2015) menggunakan daun singkong sebagai antihiperqlikemia. Pada masyarakat umum, daun singkong banyak dikonsumsi sebagai lauk pauk karena kandungan protein yang tinggi, juga digunakan untuk menyembuhkan diare, rematik, menyembuhkan luka, dll. Pada bidang peternakan, daun singkong sering diberikan sebagai pakan ternak karena kandungan gizi yang baik, sehingga ternak tumbuh dengan sehat.

## 2.2 Asam Sianida (HCN)

### 2.2.1 Sianogenesis pada daun singkong

Glukosida sianogenik merupakan senyawa hidrokarbon yang terikat dengan gugus CN dan gula. Pada tanaman, glukosida sianogenik memiliki fungsi sebagai protektor terhadap gangguan hewan herbivora. Salah satu senyawa glikosida sianogenik yang terdapat pada daun singkong adalah linamarin (95%). Linamarin atau  $\beta$ -glukosidase dapat di jumpai di tanaman singkong dengan jumlah terbesar berada pada daun singkong. Sianogenesis dimulai ketika jaringan tanaman singkong mengalami kerusakan secara fisik (White *et al.*, 1994). Oleh karena itu, setelah jaringan tumbuhan ini dihaluskan dan dimaserasi linamarin terlepas dari vakuola-vakuola dan terjadi hidrolisis linamarin oleh enzim linamarase menghasilkan aseton sianohidrin dan glukosa. Aseton secara spontan atau enzimatik (melalui hydroxynitril lyase) akan terurai menjadi sianida dan aseton yang dipengaruhi suhu dan pH (McMahon *et al.*, 1995), seperti pada gambar berikut:



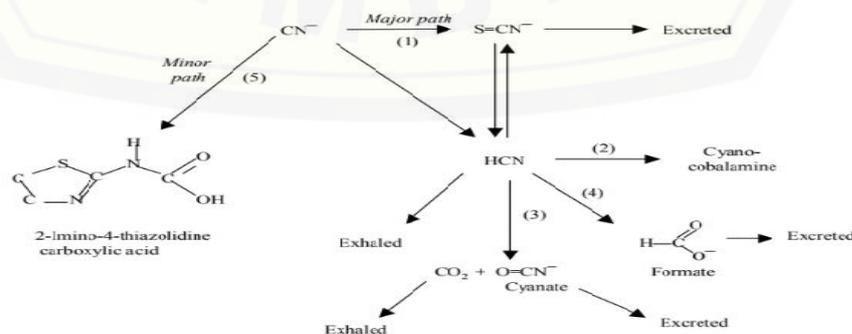
Gambar 2.2 Sianogenesis linamarin

### 2.2.2 Absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi glikosida sianogenik

Semua sianida yang tertelan akan ada di dalam tubuh dengan pH fisiologis lambung sebagai HCN. Asam sianida yang masuk ke dalam tubuh akan diabsorpsi oleh lambung dan usus halus. Sebelum masuk ke dalam aliran darah, asam sianida akan melewati hati untuk dimetabolisme. Dalam hati, asam sianida sebagian besar akan dinetralkan oleh enzim rhodanase. Konsentrasi sianida lebih banyak terdapat pada eritrosit daripada plasma darah. Hal ini merupakan wujud dari kemampuan sianida yang akan berikatan dengan methemoglobin dan hemoglobin. Kadar asam sianida yang terakumulasi di dalam setiap organ berbeda-beda. Akumulasi asam sianida terbanyak terdapat pada organ darah, ginjal, hati, dan otak (ECETOC, 2007).

Sianida dapat dimetabolisme lewat beberapa jalur sebagai berikut:

- Transulfurasi melalui enzim rhodanase atau 3-mercaptopyruvat sulfotransferase. Sianida akan menerima sebuah atom sulfur dari tiosulfat dan dikonversi menjadi tiosinat dengan sifat toksis yang rendah. Jalur ini merupakan jalur utama dari metabolisme asam sianida.
- Bereaksi dengan hidroksokobalamin menjadi sianokobalamin (vitamin B12).
- Oksidasi menjadi sianat dan karbon dioksida.
- Hidrolisis menjadi format, tiosianat, kobalamin, dan format diekskresikan melalui urin, sedangkan HCN dan CO<sub>2</sub> diekskresikan melalui sistem pernafasan (ECETOC, 2007), untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 2.3 Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi Glikosida Sianogenik

### 2.2.3 Patomekanisme gangguan ginjal akibat glikosida sianogenik

Menurut Wangari dalam Salkowski dan Penney (1994) pada umumnya konsumsi HCN dengan dosis normal tidak membahayakan tubuh, dikarenakan enzim-enzim di dalam tubuh dapat menetralkannya, lalu terekskresi lewat urin. HCN yang masuk ke dalam tubuh melalui jalur oral langsung diabsorpsi oleh tubuh. Setelah diabsorpsi, sianida dengan cepat didistribusikan di dalam tubuh melalui aliran darah. Namun hanya sebagian mencapai aliran darah karena melalui metabolisme di hepar terlebih dahulu (ECETOC, 2007). Keracunan asam sianida disebabkan karena terlalu banyak sianida yang masuk ke dalam tubuh. Keracunan HCN disebabkan oleh adanya formasi kompleks dengan ferri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pada sitokrom oksidase yang ada di dalam jaringan pada tingkatan sel. Formasi ini menyebabkan terhambatnya oksigen dalam menerima elektron dari sitokrom oksidase, sehingga timbulnya sitotoksis anoksia. Hal ini mengakitbatkan oksigen yang dibutuhkan oleh sel tersedia, namun tidak bisa digunakan oleh sel tersebut, sehingga menyebabkan gagalnya metabolisme secara aerobik (ECETOC, 2007).

Selain dapat menghambat sitokrom oksidase, asam sianida juga dapat menyebabkan deplesi ATP. Hal ini memicu terjadinya penghambatan metabolisme oksidatif glukosa yang mendukung jalur anaerobik untuk berlangsung. Karena jalur anaerobik berlangsung, akan menyebabkan kematian secara cepat akibat hipoksia jaringan. (Kumar *et al.*, 2003).

Pada penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, diketahui bahwa sianida dapat meningkatkan kadar kalsium intrasel karena deplesi ATP dan penambahan dua jalur tambahan di dalamnya. Peningkatan kalsium sitosol memicu terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan nitrogen monoksida (NO) yang dimediasi oleh aktivasi fosfokinase C (PKC). PKC mengaktifkan fosfolipase A2 (PLA2) dan mengaktifasi kaskade asam arakidonat, kedua jalur *cyclo-oxygebase* (COX) dan lipoksidenase. Hal ini menyebabkan peningkatan kadar ROS dalam retikulum endoplasma. Peningkatan kadar ROS dan NO ini nantinya yang akan mendasari terbentuknya *malone dialdehyde* (MDA) dalam sitotoksisitas dan apoptosis sel (ECETOC, 2007).

Kandungan sianida yang dapat menyebabkan gangguan pada tiap organ berbeda-beda dosisnya. Di lambung sebesar 0,03; darah 0,5; hati 0,03; ginjal 0,11; otak 0,07; dan darah 0,2 (mg/100g) kandungan sianida yang dapat menyebabkan kasus fatal (Food Standarts Australia New Zealand, 2004). Ginjal merupakan salah satu organ yang mendapatkan efek kerusakan dari sianida. Darah yang membawa hasil sisa metabolisme tubuh akan difiltrasi di dalam glomerulus dan kemudian dibawa ke tubulus ginjal, beberapa zat yang masih dibutuhkan tubuh akan direabsorpsi dan zat sisa yang tidak dibutuhkan akan disekresi dalam bentuk urine (Purnomo, 2012).

### 2.3 Uji Toksisitas

Uji toksisitas adalah suatu uji yang digunakan untuk mendeteksi efek toksis suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis respon yang khas dari sediaan uji. Data yang diperoleh dapat digunakan sebagai informasi untuk mengetahui bahaya derajat sediaan uji bila dipaparkan pada manusia, sehingga dapat menentukan jumlah dosis yang penggunaannya aman untuk manusia (BPOM, 2014).

Uji toksisitas menggunakan hewan uji sebagai model untuk mengetahui adanya reaksi biokimia, fisiologik, dan patologik pada manusia terhadap suatu sediaan uji. Hasil dari uji toksisitas tidak dapat digunakan sepenuhnya untuk membuktikan keamanan suatu bahan atau sediaan pada manusia, tetapi dapat digunakan sebagai petunjuk untuk mengetahui adanya toksisitas relatif dan membantu identifikasi efek toksik bila terjadi pemaparan pada manusia (BPOM, 2014).

Faktor-faktor yang menentukan hasil uji toksisitas secara *in vivo* dapat dipercaya adalah: pemilihan spesies hewan uji, galur dan jumlah hewan; cara pemberian sediaan uji, pemilihan dosis uji, efek samping sediaan uji; teknik dan prosedur pengujian termasuk cara penanganan hewan selama percobaan. Dalam uji toksisitas terdapat dua jenis uji, uji toksisitas umum dan uji toksisitas khusus. Dalam penelitian ini digunakan uji toksisitas umum. Uji toksisitas umum terdiri dari uji toksisitas akut, subkronis dan kronis. Uji toksisitas akut adalah suatu

pengujian yang bertujuan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji yang diberikan oral dengan prinsip pemberian satu dosis perkelompok kemudian diamati efek toksik dan kematian. Uji toksisitas subkronis adalah suatu pengujian yang bertujuan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang selama sebagian umur hewan dengan prinsip pemberian satu dosis per kelompok selama 28 atau 90 hari. Uji toksisitas kronis adalah suatu pengujian yang bertujuan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang selama seluruh umur hewan dengan prinsip pemberian dosis selama lebih dari 12 bulan. Pada uji toksisitas umum, langkah awal yang digunakan untuk penentuan keamanan suatu zat atau sediaan adalah uji toksisitas akut (BPOM, 2014).

### 2.3.1 Uji Toksisitas Akut

Tujuan dari uji toksisitas akut pedoman BPOM adalah untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat sehingga dapat menilai ada atau tidaknya suatu efek toksik pada sediaan uji dengan menentukan nilai  $LD_{50}$  (*median lethal dose*). Dalam penelitian ini digunakan metode uji toksisitas akut menurut pedoman *organization for economic cooperation and development* (OECD) 420 *Fixed Dose Procedure* (FDP). Metode *Fixed Dose Procedure* (FDP) memiliki prinsip uji toksisitas akut dengan mengelompokkan hewan uji dengan jenis kelamin yang sama ke dalam beberapa kelompok dosis yang telah ditentukan oleh OECD 420, yaitu 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg dengan menggunakan 5 hewan uji tiap kelompoknya (OECD, 2001).

Pada uji toksisitas akut OECD 420, langkah pertama yang dilakukan adalah uji pendahuluan. Fungsi dari uji pendahuluan adalah untuk menentukan dosis awal dengan menggunakan satu hewan coba pada tiap dosisnya. Hewan uji yang digunakan adalah tikus dengan jenis kelamin betina. Uji toksisitas akut OECD 420 ini digunakan untuk mengetahui senyawa berbahaya dan senyawa

tersebut akan dimasukkan kedalam klasifikasi tingkat toksisitas OECD (OECD, 2001).

### 2.3.2 Kriteria Penggolongan Sediaan Uji Menurut OECD (2001)

Penggolongan sediaan uji dapat digunakan untuk mengetahui senyawa atau zat yang berbahaya sesuai tingkatan dari dosis. Hasil toksisitas akut dapat dievaluasi berdasarkan kriteria bahaya dari GHS (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*) yang terdapat dalam Thirteenth Addendum to The OECD Guidelines for The Testing of Chemicals (2001), seperti pada tabel 2.1. Kriteria penggolongan menurut OECD (2001) digunakan untuk penentuan kategori toksisitas akut bahan kimia seperti pestisida serta untuk pelabelannya.

Tabel 2.1 Kriteria Penggolongan sediaan uji menurut OECD (pada tikus)

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

Sedangkan untuk obat, obat tradisional bahan lainnya seperti bahan pangan, penentuan kategori toksisitas akut, digunakan penggolongan klasifikasi seperti pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Penggolongan sediaan uji

Tingkat toksisitas	LD <sub>50</sub> Oral (pada tikus)	Klasifikasi
1	≤ 1 mg/kg	Sangat toksik
2	1-50 mg	Toksik
3	50-500 mg	Toksik sedang
4	500-5000 mg	Toksik ringan
5	5-15 g	Praktis tidak toksik
6	≥ 15 g	Tidak membahayakan

#### 2.4 Anatomi dan Fisiologi Ginjal

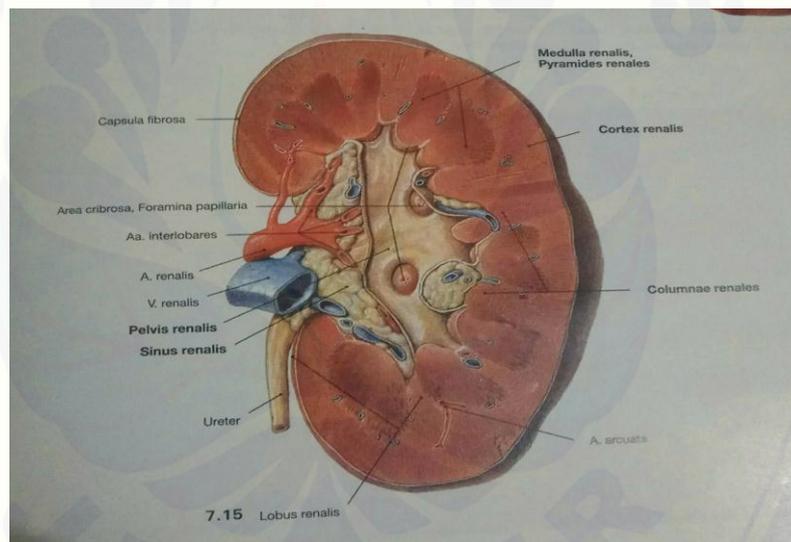
Ginjal adalah sepasang organ saluran kemih yang terletak di rongga retroperitoneal bagian atas. Bentuknya menyerupai kacang dengan sisi cekungnya menghadap ke medial. Cekungan ini disebut sebagai hilus renalis, yang di dalamnya terdapat apeks pelvis renalis dan struktur lain yang merawat ginjal, yakni pembuluh darah, sistem limfatik, dan sistem saraf. Secara anatomis ginjal

terbagi menjadi 2 bagian, yaitu bagian korteks dan medula ginjal. Korteks ginjal terletak pada lebih superfisial dan di dalamnya terdapat banyak nefron. Nefron merupakan unit fungsional terkecil ginjal. Medula ginjal terletak lebih profundus dan terdapat banyak duktus atau saluran yang mengalirkan hasil ultrafiltrasi berupa urin (Purnomo, 2012).

Nefron terdiri dari glomerulus, tubulus kontortus proksimal, *loop of henle*, tubulus kontortus distalis, dan duktus koligentes. Darah yang membawa hasil sisa metabolisme tubuh akan difiltrasi di dalam glomerulus dan kemudian di bawa ke tubulus ginjal, beberapa zat yang masih dibutuhkan tubuh akan direabsorpsi dan zat sisa yang tidak dibutuhkan akan disekresi dalam bentuk urin (Purnomo, 2012). Secara fisiologis ginjal memiliki banyak peran dalam mempertahankan stabilitas lingkungan cairan internal (Sherwood, 2013), seperti mempertahankan keseimbangan air di tubuh, sehingga masuk dan keluarnya semua bahan dalam lingkungan cairan internal mampu mempertahankan homeostasisnya, mempertahankan osmolaritas cairan tubuh yang sesuai, terutama melalui regulasi keseimbangan H<sub>2</sub>O guna mencegah fluks-fluks osmotik masuk atau keluar, yang masing-masing dapat menyebabkan pembengkakan atau penciutan sel yang merugikan, mengatur jumlah dan konsentrasi sebagian besar ion *CEs*, termasuk Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, dan Mg<sup>2+</sup>, jika hal ini tidak teratur maka dapat menyebabkan sesuatu yang abnormal bagi tubuh, seperti perubahan pada K<sup>+</sup> akan menyebabkan disfungsi jantung yang dapat menyebabkan kematian, mempertahankan volume plasma yang tepat guna mengatur tekanan darah arteri melalui peran regulatorik ginjal dalam keseimbangan NaCl dan H<sub>2</sub>O, membantu mempertahankan keseimbangan asam-basa tubuh yang tepat dengan menyesuaikan pengeluaran H<sup>+</sup> dan HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> di urin, mengeluarkan produk-produk akhir sisa metabolisme tubuh, seperti urea, asam urat, kreatinin, bilirubin, dan hormon metabolit. Jika dibiarkan menumpuk, bahan-bahan sisa ini akan bersifat toksik, terutama pada otak, lalu mengekskresikan senyawa asing, seperti obat, adiktif makanan, pestisida, dan bahan eksogen non-nutritif lain yang masuk ke dalam tubuh, menghasilkan eritropoitin yang berfungsi untuk merangsang pembentukan sel darah merah di sumsum tulang, menghasilkan renin yang

berfungsi untuk memicu suatu reaksi berantai yang penting dalam konservasi garam oleh ginjal dan mengubah vitamin D menjadi bentuk aktifnya, sehingga dapat digunakan untuk menyerap kalsium yang penting untuk pertumbuhan tulang.

Ginjal merupakan salah satu sasaran utama dari efek toksik karena peranannya dalam mengkonsentrasikan toksikan pada filtrat, membawa toksikan melalui sel tubulus dan mengaktifkan toksikan tertentu (Nuridayanti, 2011). Perubahan yang ditunjukkan dapat dilihat dari perubahan biokimia sampai kematian sel, yang umumnya muncul sebagai perubahan fungsi ginjal sampai dengan gagal ginjal, sehingga untuk mengetahui adanya masalah pada ginjal dapat dilakukan pemeriksaan penunjang seperti pemeriksaan BUN, kreatinin, dan lain-lain.



Gambar 2.4 Anatomi Ginjal

(Sumber: Paulsen, F & Waschke, J, 2010)

## 2.5 Pemeriksaan *Blood Urea Nitrogen* (BUN)

### 2.5.1 Metabolisme *Blood Urea Nitrogen* (BUN)

BUN atau ureum adalah suatu produk sisa dari pemecahan protein. Kadar ureum dalam darah bergantung pada pemecahan protein di dalam hati yang di sekresikan ke dalam ginjal dan terekskresikan melalui urin.

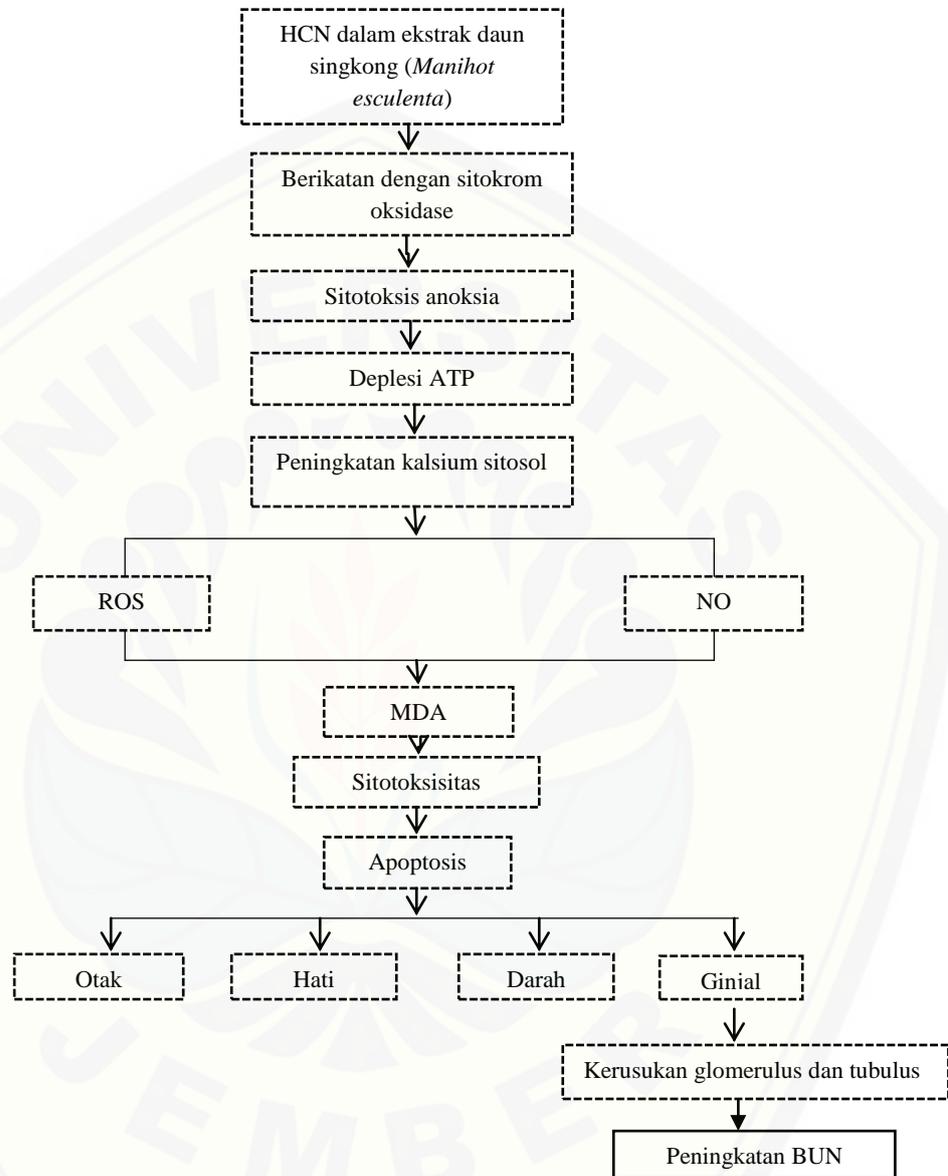
Reabsorpsi urea bisa terjadi karena adanya reabsorpsi H<sub>2</sub>O yang berlangsung di tubulus proksimal akibat reabsorpsi aktif Na<sup>+</sup> menghasilkan gradien konsentrasi untuk urea yang mendorong reabsorpsi pasif bahan sisa ini. Reabsorpsi H<sub>2</sub>O besar-besaran di tubulus proksimal secara bertahap akan mengurangi filtrat dari semula 125 ml/menit menjadi hanya 44 ml/menit cairan yang tertinggal di lumen diakhir tubulus proksimal. Bahan-bahan yang telah terfiltrasi tetapi belum terabsorpsi di tubulus proksimal akan menjadi semakin pekat karena H<sub>2</sub>O telah terabsorpsi sementara bahan sisa masih tertinggal, salah satu bahan sisa ini adalah urea. Konsentrasi urea sewaktu difiltrasi di glomerulus identik dengan konsentrasinya di plasma yang masuk ke dalam kapiler peritubulus. Namun, jumlah urea yang ada dalam 125 ml cairan yang difiltrasi di awal tubulus proksimal terkonsentrasi tiga kali lipat dalam 44 ml cairan yang tersisa di akhir tubulus proksimal. Akibatnya, konsentrasi urea di dalam cairan tubulus menjadi jauh lebih besar daripada konsentrasi urea di kapiler sehingga terbentuk gradien konsentrasi untuk urea sehingga urea akan berdifusi dari lumen tubulus ke dalam plasma kapiler peritubulus. Peningkatan konsentrasi kadar urea di plasma adalah salah satu karakteristik kimiawi pertama yang teridentifikasi sebagai gagal ginjal berat. Karena hal ini, pengukuran klinis BUN digunakan sebagai ukuran kasar fungsi ginjal (Sherwood, 2013).

Pemeriksaan BUN dapat dilakukan di berbagai laboratorium klinik. Biasanya pemeriksaan ureum akan dilakukan bersama dengan pemeriksaan kreatinin. Pemeriksaan ini menggunakan sampel serum darah. Nilai normal ureum pada manusia berkisar antara 20-40mg/dl (Efendi *et al.*, 2014) dan pada tikus 11-23 mg/dl (The laboratory rat, 1988). Kadar ureum akan meningkat jika terjadi gangguan pada ginjal, tetapi ada faktor lain yang mempengaruhi meningkatnya kadar ureum di darah, yaitu saat terjadi gangguan reabsorpsi pada keadaan dimana urin lambat (dehidrasi) dan juga diet tinggi protein. Kadar ureum yang tinggi dapat dikurangi dengan cara pengaturan diet rendah protein untuk pasien dengan gagal ginjal kronis.

### 2.5.2 Pengukuran *Kadar Blood Urea Nitrogen (BUN)*

Pemeriksaan BUN atau ureum bertujuan untuk mengetahui kondisi faal ginjal. Peningkatan kadar BUN dapat memicu terjadinya hiperuremia atau azotemia. Pengukuran kadar BUN dilakukan dengan metode *Enzymatic UV test*, Urease – GLDH.. Nitrogen urea oksidase menggunakan enzim urase dan enzim GLDH, perubahan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm pada suhu 37°C. Absorbansi tepat pada detik ke -30 dicatat sebagai (A1), kemudian absorbansi pada detik ke-90 dicatat sebagai (A2) (BPOM,2014). Pada pemeriksaan BUN, spesimen yang dapat digunakan yaitu, serum, plasma (tanpa amonium heparin) dan urin segar.

## 2.6 Kerangka Konseptual



Keterangan

- : Memicu
- ▭ : Parameter yang diuji
- - - : Parameter yang tidak diuji

Gambar 2.5 Kerangka konseptual

Linamarin yang masuk ke dalam tubuh telah mengalami sianogenisis menjadi HCN. HCN yang masuk ke dalam tubuh melalui jalur oral langsung diabsorpsi oleh tubuh. Setelah diabsorpsi, sianida dengan cepat didistribusikan di dalam tubuh melalui aliran darah. Keracunan HCN disebabkan oleh adanya formasi kompleks dengan ferri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pada sitokrom oksidase yang ada di dalam jaringan pada tingkatan sel. Formasi ini menyebabkan terhambatnya oksigen dalam menerima elektron dari sitokrom oksidase, sehingga timbulnya sitotoksitas anoksia dan menyebabkan deplesi ATP. Deplesi ATP akan meningkatkan kadar kalsium intrasel, sehingga memicu terbentuknya ROS dan nitrogen monoksida NO yang di mediasi oleh aktivasi PKC. PKC mengaktifkan PLA2 dan mengaktifkan kaskade asam arakidonat, kedua jalur COX dan lipoksidase. Hal ini menyebabkan peningkatan kadar ROS dalam retikulum endoplasma. Peningkatan kadar ROS dan NO ini nantinya yang akan mendasari terbentuknya MDA yang menyebabkan sitotoksitas sel dan berujung apoptosis sel (ECETOC, 2007).

Kandungan sianida yang dapat menyebabkan gangguan pada tiap organ berbeda-beda dosisnya. Pada ginjal sebanyak 0,11 kandungan sianida yang dapat menyebabkan kasus fatal (Food Standards Australia New Zealand, 2004). Ginjal merupakan salah satu organ yang mendapatkan efek kerusakan dari sianida karena fungsinya untuk membawa hasil sisa metabolisme untuk difiltrasi di dalam glomerulus dan kemudian di bawa ke tubulus ginjal, sehingga kedua bagian ginjal tersebut mengalami kerusakan yang dapat di ketahui melalui pemeriksaan BUN

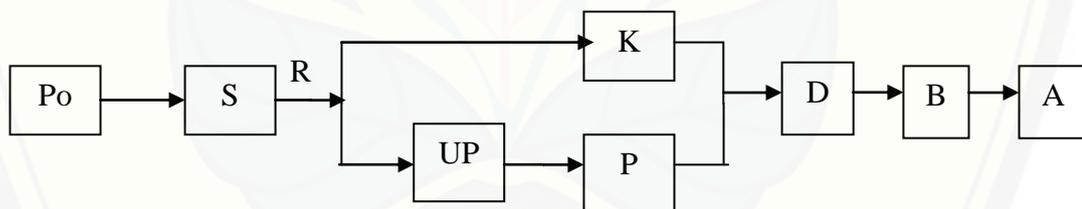
## 2.7 Hipotesis

Ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) dapat meningkatkan kadar *blood urea nitrogen* (BUN) pada tikus.

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang akan dilakukan adalah *post test–only control group design*, dimana pada desain penelitian tidak dilakukan *pre test* dan hanya dilakukan *post test* dengan rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap. Penelitian ini merupakan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui efek yang diinginkan (Notoatmodjo, 2012). Rancangan percobaan berupa kuasi eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat efek toksisitas ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) yang dilihat dari kadar BUN pada tikus. Secara skematis rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

**Keterangan:**

- Po : Populasi tikus
- S : Sampel
- R : Randomisasi
- K : Kelompok kontrol normal dengan pemberian Na CMC
- UP : Uji pendahuluan
- P : Kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta*) yang sudah disuspensi oleh Na CMC. Dosis yang diberikan pada kelompok ini disesuaikan dengan hasil uji pendahuluan. Apabila tikus dalam uji pendahuluan tetap hidup selama 14 hari maka dosis yang digunakan 2000 mg/kgBB. Jika tikus dalam uji pendahuluan mati selama uji berlangsung maka uji pendahuluan akan dilanjutkan dengan dosis yang lebih rendah mulai dari 300 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, hingga 5 mg/kgBB sampai tercapai hasil yang diinginkan. Dalam kelompok ini digunakan lima ekor tikus dengan salah satu tikus di dalamnya adalah tikus yang telah melalui uji pendahuluan (OECD, 2001).
- D : Pengambilan sampel darah intrakardial
- B : Pemeriksaan BUN
- A : Analisis data

## 3.2 Klasifikasi dan Definisi Operasional Variabel

### 3.2.1 Klasifikasi variabel

#### a. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) yang didapatkan melalui uji pendahuluan dengan dosis yang diuji yaitu 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg.

#### b. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar BUN tikus yang diukur menggunakan spektrofotometer.

#### c. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:

1. Usia hewan coba, usia tikus yang digunakan berkisar antara 8-12 minggu karena sudah matur.
2. Jenis kelamin yang digunakan adalah betina.
3. Berat badan tikus yang digunakan berkisar antara 100-200 gram karena merupakan berat badan ideal.
4. Pemeliharaan dan perlakuan mencit dilakukan di sebuah kandang beralaskan sekam kering. Pada setiap kandangnya berisi 1 ekor tikus dengan pemberian makanan turbo dan minuman berupa air pada setiap kandangnya.
5. Waktu dan lama perlakuan tikus, perlakuan hewan coba pada uji pendahuluan dilakukan selama 1 hari dan diamati selama 14 hari, begitu juga dengan uji utama, perlakuan dilakukan 1 hari dan diamati selama 14 hari.
6. Dosis pemberian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*).

### 3.2.2 Definisi operasional variabel

#### a. Ekstrak Daun Singkong

Ekstrak daun singkong adalah ekstrak yang diperoleh dari daun singkong yang dipotong kecil-kecil, dikeringkan, kemudian dihaluskan. Daun singkong yang telah halus dilarutkan melalui metode perkolasi dengan pelarut etanol 70%. Ekstrak diberikan secara per oral melalui sonde dengan dosis yang telah ditentukan pada uji pendahuluan, yaitu 3/50/300/2000 mg/kgBB atau dosis maksimal yang di sarankan oleh *animal welfare*. Pada penelitian ini digunakan dosis uji pendahuluan yaitu 2000mg/kg dikarenakan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan Pradini (2015) didapatkan nilai LD<sub>50</sub> (*lethal dose 50%*) sebesar 11.080 mg/kgBB sehingga peneliti menggunakan dosis maksimal yang dianjurkan, tetapi jika tidak ditemukan penelitian sebelumnya maka dosis yang digunakan adalah 300 mg/kgBB (OECD, 2011). Pemberian ekstrak dilakukan satu kali pada uji pendahuluan dan uji utama, serta diamati selama 14 hari.

#### b. *Blood Urea Nitrogen* (BUN)

BUN atau ureum adalah produk nitrogen terbesar yang dikeluarkan melalui ginjal yang berasal dari diet dan protein endogen yang telah difiltrasi oleh glomerulus dan sebagian direabsorpsi oleh tubulus (Efendi *et al.*, 2014). Pemeriksaan BUN merupakan salah satu penilaian dari kondisi ginjal. Data yang dihasilkan berupa data interval.

### 3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang berada di Jalan Kalimantan No.37, Sumbersari, Kabupaten Jember, Jawa Timur yang dimulai dari bulan Oktober sampai November 2017.

### 3.4 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.4.1 Alat

Alat- terdiri dari gunting, gelas beker , gelas ukur, pipet tetes, spatula, batang pengaduk, erlenmeyer, labu 100 ml, kertas saring vial, timbangan analitik, spuit, tabung non EDTA, sonde, kandang mencit, masker, sarung tangan, kalorimetri, tabung, sentrifuge, pemanas air, timbangan hewan, papan bedah, dan alat bedah steril.

#### 3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan yaitu; aquadest, etanol 70%, pakan mencit, eter, larutan TRIS, larutan 2-oksoglutarat, ADP, urease, GLDH dan NADH.

#### 3.4.3 Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong (*Manihot esculenta*) yang bisa ditemukan di Kabupaten Jember.

#### 3.4.4 Hewan Coba

Hewan percobaan yang digunakan dalam pengukuran kadar BUN adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*). Hewan percobaan berkisar antara umur 8-12 minggu bulan dengan bobot 100-200 gram. Jumlah hewan coba yang digunakan tidak menggunakan rumus besar sampel dikarenakan mengikuti pedoman metode uji toksisitas *organization for economic cooperation and development* (OECD) 420 *Fixed Dose Procedure* (FDP). Metode *Fixed Dose Procedure* (FDP) menggunakan 5 ekor hewan coba dalam uji utama untuk setiap kelompoknya (OECD, 2001) dan ditambah 5 ekor hewan coba untuk pembanding (kelompok kontrol) sehingga dibutuhkan 10 ekor hewan coba. Dalam penelitian ini digunakan 2 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol (Kn) dan kelompok

perlakuan (P). Berdasarkan hal tersebut, maka jumlah sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini sebanyak 10 ekor yang dibagi sama rata dalam 2 kelompok dengan teknik *simple random sampling* dan tikus diperoleh dari Universitas Brawijaya.

a. Kriteria Inklusi

1. Tikus putih galur Wistar (*Rattus norvegicus*)
2. Jenis kelamin betina
3. Berat badan 100 – 200 gram
4. Umur 8 – 12 minggu
5. Tingkah laku dan aktivitas normal
6. Tidak ada kelainan anatomi yang nampak

b. Kriteria Eksklusi

1. Tikus tampak sakit
2. Terdapat abnormalitas anatomi yang tampak
3. Tikus mati

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Penyediaan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*)

Proses ekstraksi adalah suatu proses penyarian zat aktif dari bagian tanaman obat yang bertujuan untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bagian tanaman obat (Marjoni, 2016). Tahap awal yang dilakukan adalah determinasi daun singkong yang dilakukan di Fakultas MIPA. Daun singkong dibersihkan dengan cara dicuci menggunakan air lalu dijemur di ruang terbuka dengan terkena cahaya matahari langsung. Setelah dipastikan kering, daun singkong dihaluskan hingga menjadi serbuk menggunakan blender yang kemudian diayak.

Penyarian dilakukan dengan pelarut etanol 70% dengan tiga kali maserasi. Maserasi pertama dilakukan dengan melarutkan 1,5 liter etanol 70% selama satu hari, lalu larutan yang keruh di pindahkan ke dalam botol kaca. Maserasi kedua

dilakukan dengan melarutkan 1 liter etanol 70% selama satu hari, lalu larutan yang keruh di pindahkan ke dalam botol kaca. Maserasi ketiga dilakukan dengan melarutkan 0,5 liter etanol 70% selama satu hari, lalu larutan yang keruh dipindahkan ke dalam botol kaca. Setelah itu, semua rendaman disaring untuk memisahkan air dari ampas daun singkong lalu digabung menjadi satu untuk kemudian dilakukan evaporasi dengan *rotary evaporator* dengan suhu 60°, kecepatan 90 rpm, dan tekanan *vacuum* 0,4 – 0,5 kPa, sehingga diperoleh ekstrak daun singkong hingga beratnya konstan atau semua pelarut etanol 70% hilang.

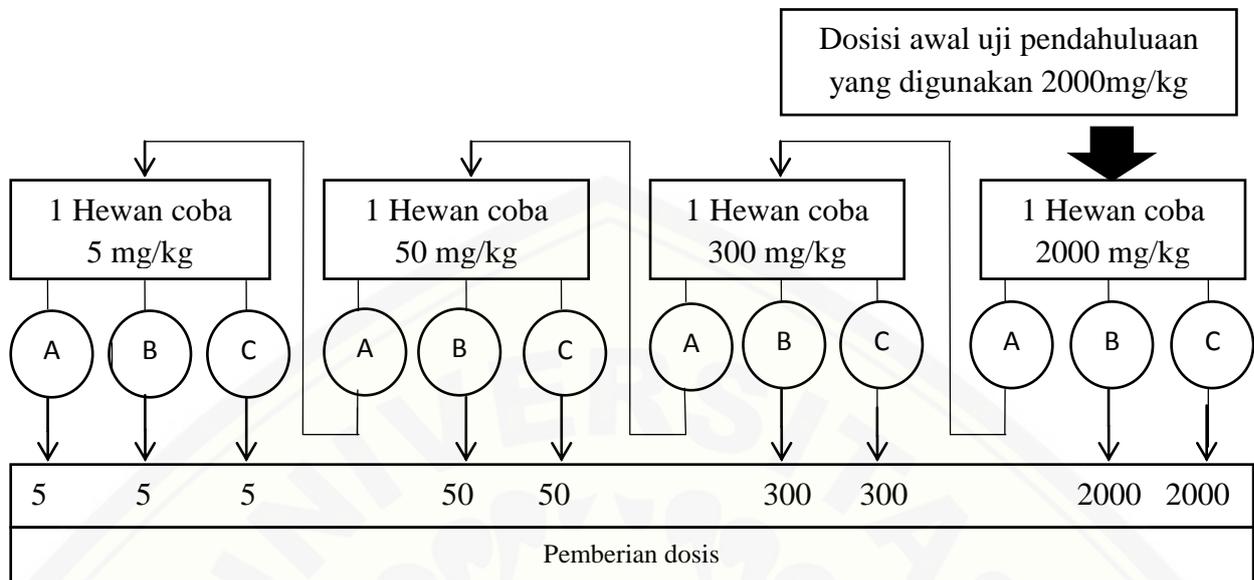
### 3.5.2 Aklimitasi

Sebelum perlakuan, hewan coba terlebih dahulu diaklimatisasikan dengan kondisi tempat penelitian, pakan dan minum selama 5 hari yang bertujuan untuk menyesuaikan tikus dengan lingkungannya. Tikus dipelihara dalam ruangan yang bersuhu  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  dan diberi cahaya selama 12 jam.

### 3.5.3 Tahap Perlakuan

#### a. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan adalah sebuah uji yang dilakukan untuk mengetahui dosis awal yang dibutuhkan pada uji utama (OECD, 2001). Uji pendahuluan dalam penelitian ini dilakukan sesuai dengan pedoman OECD tentang toksisitas oral akut 420 dengan prosedur *fixed dose*. Skema pemberian uji pendahuluan dapat dilihat pada skema 3.2.



Gambar 3.2 Skema pemberian uji pendahuluan

Keterangan

- A : Mati  
 B : Terdapat gejala toksisitas  
 C : Tidak terdapat gejala toksisitas

Sediaan uji dalam uji pendahuluan diberikan pada satu ekor tikus. Uji Pendahuluan diberikan dosis 2000mg/kgBB sebanyak satu kali dan diamati selama 14 hari. Apabila hewan coba pada uji pendahuluan tetap hidup selama 14 hari dan tidak menunjukkan gejala toksisitas, maka dosis yang digunakan dalam uji utama sebesar 2000 mg/kgBB. Jika hewan coba pada uji pendahuluan tetap hidup selama 14 hari dan menunjukkan gejala toksisitas seperti: perubahan warna kulit dan bulu, gangguan pengelihatian dan membran mukus, gangguan sistem saraf pusat, gangguan perilaku, dan gangguan pernafasan, maka dosis yang digunakan dalam uji utama sebesar 2000 mg/kgBB. Jika hewan coba pada uji pendahuluan mati selama uji berlangsung, maka uji pendahuluan dilanjutkan dengan dosis yang lebih rendah mulai dari 300 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, dan 5 mg/kgBB masing-masing dan diamati selama 14 hari hingga didapatkan dosis yang tidak menyebabkan kematian pada hewan coba.

#### b. Uji Utama

Uji utama dilakukan setelah didapatkan dosis dari uji pendahuluan. Uji ini terdiri dari dua kelompok, yakni kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P). Perlakuan hanya diberikan satu kali, setelah itu dilakukan pengamatan selama 14 hari. Tikus yang mati selama uji utama berlangsung akan diambil darahnya secara intrakardial dan dilakukan pemeriksaan BUN. Tikus yang masih bertahan hidup hingga 14 hari uji utama berlangsung akan diterminasi untuk diambil darahnya secara intrakardial dan dilakukan pemeriksaan BUN.

#### 3.5.4 Pengambilan Darah Intrakardial

Hewan coba dideterminasi setelah dilakukan uji utama selama 14 hari. Sediaan darah intrakardial diambil dengan menggunakan spuit ukuran 1 ml. Pengambilan darah secara intrakardial bertujuan untuk mempermudah peneliti untuk mendapatkan darah, dikarenakan pengambilan pada plexus retroorbitalis pada mata dan vena sapena pada kaki cukup sulit dilakukan, sedangkan pada vena ekor hanya didapatkan sedikit darah. Setelah dilakukan terminasi dan pembedahan secara langsung, lalu ditusukkan spuit tepat pada jantung tikus untuk diambil darahnya.

#### 3.5.5 Pengukuran *Kadar Blood Urea Nitrogen* (BUN)

Pemeriksaan BUN merupakan salah satu pemeriksaan faal ginjal yang berguna untuk melihat kondisi ginjal. Pemeriksaan ini menggunakan sampel plasma darah. Pengukuran diawali dengan mengambil darah sejumlah 10  $\mu$ l, serum uji direaksikan dengan 1000  $\mu$ l pereaksi uji, dimana pereaksi uji terdiri dari TRIS pH 7,8, 2-oksoglutarat, ADP, Urease, GLDH dan NADH, lalu dihomogenkan menggunakan vortex. Absorbansi dihomogenkan dengan menggunakan spektrofotometer pada suhu 37°C tepat pada detik ke-30 pada panjang gelombang 340 mm sebagai (A1), kemudian absorbansi diukur lagi tepat pada detik ke-60 sebagai (A2). Hal yang sama dilakukan pada blangko (pereaksi

+ aquades) dan standar (pereaksi + standar nitrogen urea (50 mg/dL)). Kadar nitrogen urea dapat dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan absorbansi nitrogen urea standar yang dikalikan dengan konsentrasi nitrogen urea standar. Rumus yang akan digunakan sebagai berikut (BPOM,2014):

$\Delta A$  sampel adalah ( $A_2 - A_1$ )

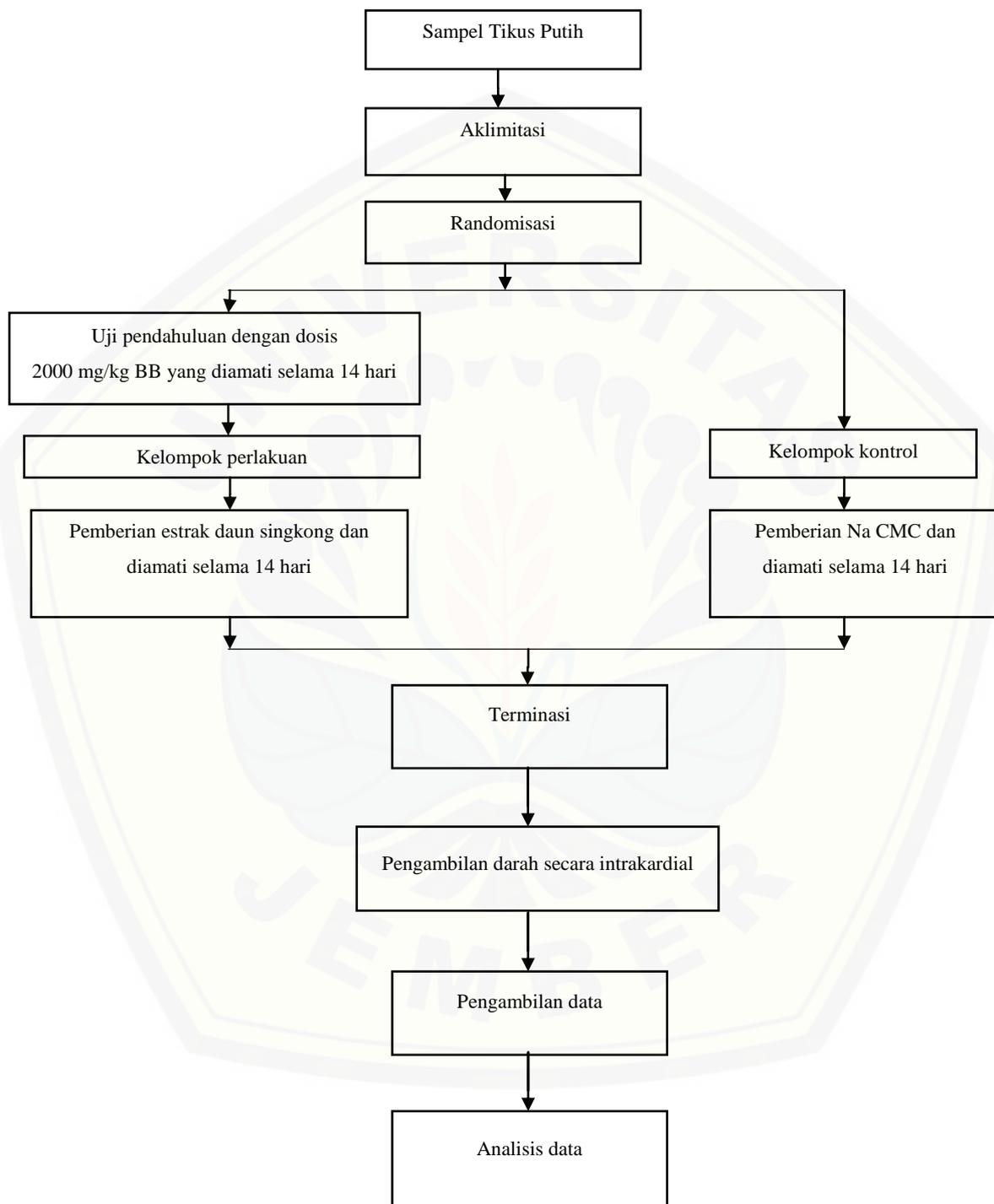
$\Delta A$  blangko adalah ( $A_2 - A_1$ )

$$\text{Nitrogen urea (mg/dL)} = \frac{\Delta A \text{ Sampel} - \Delta A \text{ blangko}}{\Delta A \text{ Standar} - \Delta A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi standar (mg/dL)}$$

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara komputerisasi dan dibantu dengan perangkat lunak berupa program statistik. Data akan diolah dengan menggunakan perangkat lunak komputer *SPSS 18,0 for Windows*. Uji statistik pada penelitian ini menggunakan uji beda. Sebelum dilakukan uji beda, dilakukan uji normalitas data menggunakan *Shapiro Wilk* karena sampel yang digunakan <50 dan Uji *Lavane* untuk mengetahui homogenitas terlebih dahulu. Apabila data yang didapatkan terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan Uji *T-test* ( $p < 0,05$ ) dan apabila data yang didapatkan terdistribusi tidak normal dan tidak homogen, maka dilanjutkan dengan Uji *Mann Whitney* ( $p > 0,05$ ).

### 3.7 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Alur Penelitian

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa dosis toksik ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) tidak menyebabkan peningkatan yang bermakna terhadap kadar *blood urea nitrogen* (BUN) pada kelompok perlakuan yang diinduksi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*).

### 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan oleh peneliti dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis toksis daun singkong dengan menggunakan metode non single dose atau dosis melebihi 2000 mg/kgBB.
- b. Perlu adanya penelitian lebih lanjut dengan menambahkan beberapa variabel guna mengetahui efek yang ditimbulkan oleh ekstrak daun singkong.
- c. Perlu dilakukan uji toksisitas pada tahapan berikutnya guna menguji keamanan ekstrak daun singkong untuk menjadi terapi pada manusia.
- d. Perlu diperhatikan pemberian makanan, minuman dan perawatan pada kelompok kontrol.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Askar, S. 1996. *Daun Singkong dan Pemanfaatannya Terutama Sebagai Pakan Tambahan*. Bogor: Balai Penelitian Ternak.
- Awoyinka, A. F., V. O. Abegunde, & S.R. Adewusi. 1995. Nutrient content of young cassava leaves and assessment of their acceptance as green vegetable in Nigeria. *Plant Foods for Human Nature* 47(1): 21-28.
- Backlund, B., Bauer, J.E., Nabity, M.B., Norby, Bo., & Zoran, D.L. Effects of Dietary Protein Content on Renal Parameters in Normal Cats. 2011. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13, 698-704
- Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM). 2014. *Pedoman Uji Toksisitas Klinik Secara In Vivo*. Jakarta: Tim Penyusun BPOM
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2007. *Kebijakan Obat Tradisional Nasional*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Efendi, I & Markum, H. M. S. 2014. *Pemeriksaan Penunjang Pada Penyakit Ginjal dalam Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta: Interna Publishing
- European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). 2007. *Cyanides of Hydrogen, Sodium and Potassium, and Acetone Cyanohydrin*. JACC No.53, Brussels: ECETOC.

- Food Standars Australian New Zealand (FSANZ). 2004. Cyanogenic Glycosides In Cassava And Bamboo Shoots. *Food Standars Australia New Zealand (FSANZ)*.
- Guyton, A.C. 2013. *Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit (Human Psysiology and Mechanisms of Disease) Edisi III*. Jakarta: EGC
- Kementrian Perdagangan. 2014. *Obat Herbal Tradisional*. Jakarta: Warta Ekspor.
- Kumar, V. Cotran, R. S., & Robbins, S.L. 2003. *Robbins Basic Pathology, Seventh Edition*. New York: Elsavier, Inc. Terjemahan oleh M. Asrorudin 2013. *Buku Ajar Patologi Robbins, Edisi Ketujuh*. Jakarta: EGC.
- Marjoni, R. 2016. *Dasar – Dasar Fitokimia untuk Diploma III Farmasi*. Jakarta: Trans Info Media.
- Meyer, D.J. & J. Harvey. 2003. *Interpretation And Diagnosis.*, 2nd Ed. WB. Saunders. Philadelphia. USA.
- Mcmahon J. M., White, W. L. B., & Sayre, R. T. 1995. Cyanogenesis in cassava(*Manihot esculenta Crantz*). *Journal of Experimental Botany*,vol.46.
- Nhu, P. B. H., B. Ogle, & J. E. Lindberg. 2000. Effect of replacing soybean protein with cassava leaf meal in cassava root meal based diets for growing pigs on digestibility and N retention. *Animal Feed Science and Technology* 83(3): 223-235.
- Notoatmodjo, S. 2012. *Metodelogi Penelitian Kesehatan*. Yogyakarta: Rineka Cipta.

- Normasari, R. Dewi, R. & Rachmania, S. 2017. Efek Ekstrak Daun Singkong terhadap Perbaikan Struktur dan Fungsi Ginjal Mencit yang Diinduksi Gentamisin. *Universitas Jember Digital Repository*.
- Nurdiana, A. R. 2013. Uji Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) Terhadap Jumlah Neutrofil Pada Proses Penyembuhan Luka Tikus (*Rattus norvegicus*). *Universitas Jember Digital Repository*.
- Nuridayanti, E. F. T. 2011. "Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air Rambut Jagung (*Zea mays* L.). *Library Universitas Indonesia (lib.ui.ac.id)*
- Obeten, K.B., Ushie, I.E., Udoaffah, G., & Ndiffon, O.O. 2017. Assesment of the effect of aqueous leaf extract of cassava (*Manihot esculenta*) on adult Wistar rats. *Academic journals vol.9(7).pp.*
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2001. *OECD Guideline for Testing of Chemicals. Test no: 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure*. Paris: OECD.
- Paulsen, F & J. Waschke. 2010. *Sobotta Atlas Anatomi Manusia Jilid 2*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Pradini, Y. S. 2015. Ketoksikan Akut Ekstrak Air Daun Singkong (*Manihot utilissima Pohl*) dan Gambaran Histopatologi Organ Hati pada Mencit Jantan Galur Swiss. *Perpusnwu*
- Purnomo, B. B. 2012. *Dasar-dasar Urologi Edisi 3*. Jakarta: Sagung Seto.
- Rukmana, R. 1997. *Ubi Jalar: Budidaya dan Pasca Panen*. Kanisius
- Sharp, P. E. 1998. *The Laboratory Rat*. Washington D C: CRC Press.

Sherwood, L. 2013. *Fisiologi Manusia: Dari Sel ke Sistem Edisi 8*. Jakarta: EGC.

Soelistijono. 2006. *Tanaman Singkong*, Jakarta: Penebar Swadaya.

Sukrasno, K. R, Wirasutisna & Fidrianny, I. 2007. Pengaruh Perebusan terhadap Kandungan Flavonoid dalam Daun Singkong. *Jurnal Obat Bahan Alam Vol, 6 No.2* .

Wanda, L. B. W., Diana I. Garzon, D. I. A., McMahan, J. M., & Sayre, R. T. 1998. The Role of Hydroxynitrile Lyase in Root Cyanide Production. *NCBI, 116(4)*.

Wangari, M. F. 2013. Potential Toxic Levels Of Cyanide In Cassava (*Manihot esculenta Crantz*) Grown In some Parts Of Kenya. *Library Kenyatta University*.

Warditiani, N. K., Larasanty, L. P. F., & Damanik, L. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 70% Daun Singkong (*Manihot utilissima Pohl*) terhadap Gula Darah Mencit Jantan Galur Balb/C Diinduksi Aloksan. *E-Jurnal Universitas Udayana*. Bali.

White, W. L. B, J. M. McMahon, & R. T. Sayre. 1994. Regulation of cyanogenesis in cassava. *Acta Horticulturae 375(4)*: 69-78.

Willey, J & Sons. 2017. *Practical Diabetes vol 34*. Wiley Online Library.

## LAMPIRAN

## Lampiran 3.1 Persetujuan Etik Peneliti



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

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

**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK***ETHICAL APPROVA*

Nomor : 1.164 /H25.1.11/KE/2017

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

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

**EFEK TOKSISITAS EKSTRAK DAUN SINGKONG (*MANIHOT ESCULENTA*)  
TERHADAP KADAR *BLOOD UREA NITROGEN (BUN)* PADA TIKUS PUTIH**

Nama Peneliti Utama : I Nyoman Kurniawan Agratama  
*Name of the principal investigator*

NIM : 142010101065

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
*Name of institution*

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

Jember, 20 Oktober 2017  
Ketua Komisi Etik Penelitian

Rini Riyanti, Sp.PK

### Tanggapan Anggota Komisi Etik

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

*Review Proposal* :

- Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada buku pedoman etik penelitian kesehatan ( Penggunaan hewan coba dengan prinsip 3R : *Reduced, Reused, Redefined*)
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak daun singkong agar didapatkan kadar yang diinginkan.
- Mohon diperhatikan kalibrasi alat dan kontrol kualitas reagen pada pemeriksaan BUN.
- Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan.

Mengetahui  
Ketua Komisi Etik Penelitian



dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Jember, 18 Oktober 2017

Reviewer

dr. Desie Dwi Wisudanti, M.Biomed

## Lampiran 4.1 Hasil Uji Determinasi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
 Jln. Kalimantan 37 Kampus Tegalboto Kotak Pos 159 Jember 68121  
 Telp. (0331) 334293 Fax (0331) 330225

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI**

No. 18 /2017

Ketua Laboratorium Botani Jurusan Biologi dengan ini menerangkan bahwa material tanaman yang dibawa oleh:

Nama : I Nyoman Kurniawan Agratama  
 NIP/NIM/NIK : 142010101065  
 Institusiasal : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

pada tanggal 13 November 2017, telah diidentifikasi/determinasi berdasarkan buku Flora of Java, karangan C.A. Backer dan Bakhuizen van den Brink Jr. adalah :

No.	Genus	Species	Family
1.	Manihot	<i>Manihot esculenta</i> Crantz.	Euphorbiaceae

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya

Jember, 18 November 2017

Ketua Laboratorium Botani

Dra. Dwi Setyati, M.Si.

NIP. 196404171991032001

**Lampiran 4.2 Tabel Pemberian Dosis 2000 mg/kgBB Ekstrak Daun Singkong**

Jenis	Berat Badan (g)	Dosis
Kontrol 1	190	380 mg/2ml
Kontrol 2	175	350 mg/2ml
Kontrol 3	172	344 mg/2ml
Kontrol 4	134	268 mg/2ml
Kontrol 5	136	272 mg/2ml
Perlakuan 1	170	340 mg/2ml
Perlakuan 2	150	300 mg/2ml
Perlakuan 3	167	334 mg/2ml
Perlakuan 4	144	288 mg/2ml
Perlakuan 5	127	254 mg/2ml

**Lampiran 4.3 Hasil Penghitungan Kadar BUN**

Kelompok BUN	Hasil BUN (mg/dL)	Rata-rata kadar (mg/dL)
Kontrol	1. 44,5	42,3
	2. 55,8	
	3. 35,3	
	4. 31,0	
	5. 44,9	
Perlakuan	1. 47,0	51,94
	2. 39,5	
	3. 47,0	
	4. 72,7	
	5. 53,5	

#### 4.4 Analisis Data Kadar BUN

##### 4.4.1 Uji Normalitas

**Tests of Normality**

	kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
bun	kontrol	,194	5	,200*	,954	5	,765
	perlakuan	,252	5	,200*	,877	5	,296

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

##### 4.4.2 Uji Homogenitas

**Test of Homogeneity of Variances**

bun

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,152	1	8	,707

##### 4.4.3 Uji T Test

**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means			
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference Lower
bun	Equal variances assumed	,211	-9,64000	7,09758	-26,00704
	Equal variances not assumed	,214	-9,64000	7,09758	-26,20843

## 4.5 Gambar Penelitian

### 4.5.1 Pembuatan Ekstrak Daun Singkong



### 4.5.2 Pembuatan Sediaan Oral Ekstrak Daun Singkong



### 4.5.3 Induksi Oral Ekstrak Daun Singkong dan Pengamatan



#### 4.5.4 Terminasi dan Pengambilan Darah Intrakardial



#### 4.5.5 Pemeriksaan kadar BUN

