

SKRIPSI

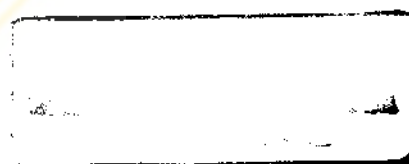
EKO YUNianto

**UJI TOKSISITAS SUBKRONIK FRAKSI ETIL ASETAT
DAUN JOHAR (*Cassia siamea*) PADA TIKUS PUTIH (*Ratus
novergicus*) JANTAN DENGAN PARAMETER DATA DARAH**



FF 118/08

Yun
u



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM
SURABAYA**

2007

LEMBAR PENGESAHAN

SKRIPSI

**UJI TOKSISITAS SUB KRONIK FRAKSI ETILASETAT DAUN
JOHAR (*Cassia siamea*) PADA TIKUS PUTIH (*Rattus
novergicus*) JANTAN DENGAN PARAMETER DATA DARAH**

**DIBUAT UNTUK MEMENUHI SYARAT
MENCAPAI GELAR SARJANA FARMASI PADA FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2007**

Oleh :

EKO YUNianto
050312777

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama



Dra. Wiyed Ekasari, Apt, MSc
NIP : 132007863

Pembimbing serta



Dra. Herri Studiawan, Apt, MS
NIP : 131569363

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kehadiran ALLAH SWT yang telah melimpahkan rahmatNya sehingga penyusun dapat menyelesaikan tugas skripsi yang berjudul **“UJI TOKSISITAS SUBBKRONIK FRAKSI ETILASETAT DAUN JOHAR (*Cassia siamea*) PADA TIKUS PUTIH (*Ratus novergicus*) JANTAN DENGAN PARAMETER DATA DARAH**

Skripsi ini dapat terselesaikan atas bantuan dan dorongan semua pihak. Untuk itu pada kesempatan ini penyusun ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

- 1 Dra. Wiwied Ekasari, Msi, Apt selaku dosen pembimbing utama yang telah berkenan meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan petunjuk, bimbingan serta dorongan sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi ini.
- 2 Drs. Herra Studiawan, MS, Apt selaku dosen pembimbing serta yang juga telah memberikan bimbingan dan masukan sehingga skripsi ini terselesaikan.
- 3 Dra. Rakhmawati, MSi, Apt dan Dra. Wijiati, Msi, drh selaku dosen penguji atas masukan yang diberikan untuk menyempurnakan skripsi ini.
- 4 Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama saya mengikuti kuliah dan melakukan penelitian ini.
- 5 Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama saya mengikuti kuliah dan melakukan penelitian ini.
- 6 Ayah, ibu, adik-adikku serta seluruh keluargaku tercinta yang selalu menyayangi dan mendoakan, memberi bantuan baik moril maupun materiil. Juga sumber motivasi, inspirasi dan semangat hidupku setiap waktu, Sofia Winata Meiliasari.
- 7 Bambang Subakti Zulkarnain, Apt, Med.Clin. Farm sebagai dosen wali serta seluruh staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah membimbing, memberi saran dan membagi ilmunya.
- 8 Kepala laboratorium Ilmu Bahan Alam yang telah menyediakan bahan dan fasilitas penelitian.
- 9 Seluruh karyawan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah membantu kelancaran studi penyusun serta seluruh mahasiswa Fakultas Farmasi UNAIR yang telah membantu penyusun secara moril dan materiil.

Semoga Allah SWT berkenan melimpahkan karunia-Nya sebagai balasan atas kebaikan dan bantuan yang telah diberikan. Dan dengan segala kekurangan dalam penyusunan skripsi ini penyusun mohon maaf dan berharap semoga skripsi ini berguna bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Agustus 2007

Penulis



RINGKASAN

**UJI TOKSISITAS SUBKRONIK FRAKSI ETIL ASETAT DAUN
JOHAR (*Cassia siamea*) TERHADAP TIKUS PUTIH (*Rattus
novergicus*) JANTAN DENGAN PARAMETER DATA DARAH**

Eko Yunianto

Di kalangan masyarakat luas, tanaman Johar (*Cassia siamea*) dimanfaatkan sebagai obat antimalaria, obat cacung, tonikum serta untuk menghilangkan gatal-gatal dan penyakit kulit (Heyne, 1987). Penelitian lebih lanjut tentang efektivitas daun *C. siamea* telah banyak dilakukan. Salah satu penelitian tersebut yaitu efektivitas fraksi etil asetat daun johar oleh Nugroho (2006) yang melakukan uji aktivitas fraksi etil asetat daun *C. siamea* terhadap *Plasmodium berghei* secara *in vivo*. Dan didapatkan harga ED₅₀ sebesar 0,46 mg/kg BB mencit. Ekasari (2006) telah melakukan uji toksistas akut fraksi etil asetat daun *C. siamea* dan didapat LD₅₀ (*Median Letal Dose*) sebesar 16,57 g/kg BB mencit. Wahjoedi (2003) telah pula melakukan uji toksisitas subkronik selama tiga bulan pada rodent (tikus) maupun non-rodent (kucing) terhadap ekstrak etanol 70 persen daun johar dengan hasil tidak menimbulkan keracunan atau hal-hal negatif lain dari beberapa organ penting tubuh maupun biokimia hewan uji, yaitu jantung, hati, paru, ginjal, lambung, Iib, SGOT, SGPT, ureum, dan kreatinin. Namun belum ada penelitian tentang uji toksisitas subkronik fraksi etilasetat daun *C. siamea*.

Untuk dapat digunakan secara luas oleh seluruh masyarakat maka sediaan dari bahan alam harus mempunyai *efficacy* dan *safety* yang jelas sebelum dipasarkan. Mengacu pada penelitian-penelitian dan alasan yang sudah ada maka perlu dilakukan uji toksisitas subkronik fraksi etilasetat daun *C. siamea*. Uji toksisitas ini dilakukan pada tikus putih (*Ratus novergicus*) jantan dengan mengamati kimia darah dan sel-sel darah.

Penelitian ini dimulai dari pembuatan fraksi etilasetat dari serbuk kering daun *C. siamea*. Serbuk seberat 9.278 kg dimacerasi dengan n-heksana disaring, lalu serbuk ampas dikeringkan kembali dan diekstraksi dengan etanol 90% yang mengandung 1% asam ttrat. Ekstrak etanol dipekatkan menggunakan rotavapor sampai kira-kira 1/3 dari volume awal. Setelah dipekatkan, dilakukan pembasaan dengan NH₄OH sampai pH 8, kemudian pelarut ekstrak etanol cair diuapkan menggunakan rotavapor. Dikeringkan di oven, sampai etanol menguap. Didapatkan ekstrak etanol yang kental sebanyak 1520 gram. Ekstrak etanol tersebut dilarutkan dalam air dan dilakukan pembasaan dengan NH₄OH sampai pH 8 dan diekstraksi menggunakan etilasetat di dalam corong pisah. Fraksi etilasetat diambil dan dipekatkan dalam rotavapor sehingga didapat sebanyak 164 gram fraksi etilasetat yang siap diujikan.

Fraksi etil asetat tersebut disuspensikan dengan CMC Na untuk diujikan pada hewan coba. Dosis yang digunakan terbagi 4 kelompok. Pada kelompok 1 yang merupakan kontrol negatif diberikan CMC-Na 0.5 % ; kelompok 2 diberikan 1 kali Dosis Lazim (6.79 mg/ 200 g tikus); kelompok 3 diberikan 5

kali Dosis Lazim (33.95 mg/ 200 g tikus);dan kelompok 4 diberikan 10 kali Dosis Lazim (67.90 mg/ 200 g tikus).

Pada uji toksisitas subkronik ini, bahan uji diberikan sekali sehari selama 30 hari dan pada hari ke-31 dilakukan pengambilan dan preparasi sampel darah. Pengamatan dilakukan dengan alat spektrofotometer Hitachi Analyzer. Dari hasil analisis data dengan metode statistik ANAVA satu arah, fraksi etilasetat daun *C. siamea* tersebut tidak menimbulkan perubahan pada parameter kimia darah dan sel-sel darah *R. Novergicus* jantan.

Berdasarkan penelitian diatas disarankan untuk dilakukan uji toksistas subkronik pengamatan pada liver dan ginjal, uji toksistas kronik dan uji teratogenitas guna melengkapi data toksisitas pada bahan obat yang akan dibuat sebagai fitofarmaka.



ABSTRACT

The test about sub chronic of Johar's (*Cassia siamea*) leaves ethyl acetate fraction was to know the constraint or limit of the safety dosage of it. The effect of it was observed by the blood of galur wistar familia white rat (*Ratus norvegicus*). This research use 48 male white rats that are divided into 4 groups. First group as control group that given CMC Na 5%, second group took dosage 6.79 mg/ 200 weight; third group took dosage 33.95 mg/ 200 g weight; and fourth group took dosage 67.90 mg/ 200 g weight. The dosage is given once a day for 30 days. Their blood are taken on the 31-st day. Then, sample preparation of their blood were made and measured them by using Hitachi Analyzer. The change on the blood components of male white rats was recorded and processed by using the Oneway-ANAVA test. The result of this test showed that Johar's leaves ethyl acetate fraction didn't influence the blood chemical components of *R. norvegicus*.

Key word : Johar (*Cassia siamea*), ethyl acetate, sub chronic, blood.



DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Hipotesis Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Tentang Tanaman <i>Cassia siamea</i>	5
2.1.1 Klasifikasi Tanaman.....	5
2.1.2 Penyebaran <i>Cassia siamea</i>	5
2.1.3 Morfologi <i>Cassia siamea</i>	5
2.1.4 Kandungan <i>Cassia siamea</i>	6
2.1.5 Khasiat <i>Cassia siamea</i>	7
2.2 Tinjauan Tentang Metode Ekstraksi	8
2.3 Tinjauan Tentang Uji Toksisitas.....	10
2.3.1 Uji Toksisitas Akut.....	11
2.3.2 Uji Toksisitas Subkronik.....	11
2.3.3 Uji Toksisitas Kronik.....	15
2.3.4 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Toksisitas.....	15
2.4 Tinjauan Tentang Hewan Coba.....	16
2.4.1 Tinjauan Tentang <i>Ratus norvegicus</i>	17
2.4.2 Klasifikasi Hewan.....	17

2.5	Tinjauan Tentang Darah.....	18
2.5.1	Tinjauan Tentang <i>Eritrosit</i>	19
2.5.2	Tinjauan Tentang <i>Leukosit</i>	20
2.5.3	Tinjauan Tentang <i>Trombosit</i>	20
2.5.4	Tinjauan Tentang Enzim SGOT/SGPT.....	21
2.5.5	Tinjauan Tentang BUN.....	21
2.5.6	Tinjauan Tentang Kreatinin.....	22
2.5.8	Tinjauan Tentang Protein Serum.....	22
2.5.7	Tinjauan Tentang Gula Darah.....	22
2.5.9	Istilah dalam Pengukuran.....	23
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....		25
3.1	Landasan Teoritik.....	25
3.2	Skema Kerangka Konseptual.....	27
BAB IV METODE PENELITIAN.....		28
4.1	Bahan Penelitian.....	28
4.1.1	Bahan Tanaman.....	28
4.1.2	Bahan Kimia.....	28
4.1.3	Hewan Coba.....	28
4.2	Alat Penelitian.....	28
4.2.1	Alat untuk Ekstraksi.....	28
4.2.2	Alat untuk Uji Toksisitas.....	28
4.3	Tahapan Kerja.....	29
4.3.1	Pembuatan Fraksi Etil Asetat.....	29
4.3.2	Pemilihan Dosis Uji Toksisitas Subkronik.....	30
4.3.3	Pembuatan Kontrol Negatif dan Larutan Uji.....	31
4.3.4	Perlakuan Terhadap Hewan Coba.....	31
4.3.5	Pengambilan Darah Hewan Coba.....	32
4.3.6	Pemeriksaan Darah dan Analisis Data.....	32
BAB V HASIL PENELITIAN.....		37
BAB VI PEMBAHASAN.....		45
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....		49
8.1	Kesimpulan.....	49

8.2	Saran.....	49
	DAFTAR PUSTAKA	50
	LAMPIRAN	52



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
II.1 Pengamatan Umum Uji Laboratorium klinik, dan Pemeriksaan Patologi yang Mungkin Digunakan dalam Penelitian Toksisitas Subkronik.....	13
II.2 Nilai komponen darah tikus normal.....	23
V.1 Hasil pembuatan fraksi etilasetat daun <i>Cassia siamea</i> Lamk.....	37
V.2 Hasil pengamatan organoleptik fraksi etilasetat daun <i>Cassia siamea</i> Lamk.....	37
V.3 Harga rerata kadar SGOT hewan coba tiap kelompok.....	38
V.4 Ringkasan ANAVA kadar SGOT hewan coba.....	38
V.5 Harga rerata kadar SGPT hewan coba tiap kelompok.....	39
V.6 Ringkasan ANAVA kadar SGPT hewan coba.....	39
V.7 Harga rerata kadar BUN hewan coba tiap kelompok.....	39
V.8 Ringkasan ANAVA kadar BUN hewan coba.....	39
V.9 Harga rerata kadar kreatinin hewan coba tiap kelompok.....	40
V.10 Ringkasan ANAVA kadar kreatinin hewan coba.....	40
V.11 Harga rerata kadar protein total darah hewan coba tiap kelompok... 40	40
V.12 Ringkasan ANAVA kadar protein total darah hewan coba.....	41
V.13 Harga rerata kadar glukosa darah hewan coba tiap kelompok.....	41
V.14 Ringkasan ANAVA kadar glukosa darah hewan coba.....	41
V.15 Harga rerata kadar hemoglobin hewan coba tiap kelompok.....	42
V.16 Ringkasan ANAVA kadar hemoglobin hewan coba.....	42
V.17 Harga rerata kadar eritrosit hewan coba tiap kelompok.....	42
V.18 Ringkasan ANAVA kadar eritrosit hewan coba.....	42
V.19 Harga rerata kadar leukosit hewan coba tiap kelompok.....	43
V.20 Ringkasan ANAVA kadar leukosit hewan coba.....	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Gambar Pohon, Bunga dan Daun (<i>C. siamea</i>).....	6
2.2 Struktur senyawa alkaloid Isokuinolina dari daun <i>C.siamea</i> (El- Sayyed SM, 1984).....	7
2.3. Tikus putih (<i>R. Novergicus</i>).....	18
2.4. Bentuk sel-sel darah	19
3.1 Bagan kerangka konseptual.....	26
4.1 Bagan pembuatan fraksi etil asetat daun <i>C.siamea</i>	33
4.2 Bagan uji toksisitas subkronik.....	34
4.3 Bagan preparasi sampel, pemeriksaan sampel dan analisis data.....	35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Konversi dosis antar spesies berdasarkan luas permukaan tubuh.....	52
2	Klasifikasi toksisitas.....	53
3	Skema metode hitung jenis leukosit.....	54
4	Skema metode hitung jumlah eritrosit.....	55
5	Skema metode hitung jumlah leukosit.....	56
6	Skema metode pemeriksaan hemoglobin.....	57
7	Penetapan kadar serum kreatinin.....	58
8	Penetapan kadar BUN.....	59
9	Penetapan kadar protein serum total.....	60
10	Penetapan kadar gula darah.....	61
11	Penetapan kadar SGOT.....	62
12	Penetapan kadar SGPT.....	63
13	Data hasil pemeriksaan kimia darah hewan coba.....	64

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Pemakaian bahan alam untuk mengatasi berbagai penyakit telah lama dilakukan. Ada beberapa keuntungan pengobatan dengan bahan alam atau fitoterapi. Keuntungan yang utama adalah ketersediaan bahan alam dalam jumlah yang cukup besar sehingga bahan alam tersebut mudah didapat terutama di negara-negara berkembang. Di samping itu, obat dari bahan alam dalam hal ini obat tradisional lebih dipercaya dan digunakan oleh sebagian besar penduduk dunia terutama di negara-negara berkembang. Efek samping dari obat bahan alam juga relatif lebih ringan dan dari segi ekonomis relatif lebih murah (Wijisekera, 1991).

Salah satu jenis tumbuhan yang telah dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah *Cassia siamea* yang dikenal masyarakat dengan nama Johar atau Juwar. Tanaman ini merupakan salah satu jenis pohon yang banyak di budidayakan di pulau Jawa. Tanaman ini mampu tumbuh pada ketinggian kurang lebih 1000 m di atas permukaan laut dan tidak memerlukan kondisi tanah yang terlalu baik (Heyne, 1987). Di kalangan masyarakat luas, tanaman *C. siamea* dimanfaatkan sebagai obat anti malaria, obat cacing, tonikum serta untuk menghilangkan gatal-gatal dan penyakit kulit (Heyne, 1987) maupun untuk obat insomnia. Kandungan utama yang terdapat pada daun *C. siamea* antara lain alkaloid, triterpenoid, dan antrakuinon (Depkes RI, 1989).

Melihat potensi yang sangat besar dari daun *C. siamea* baik sebagai bahan alam yang tersedia secara meruah dan keefektifannya secara *in vitro* maupun *in vivo* dalam mengobati penyakit malaria, maka perlu sebuah uji keamanan penggunaan daun *C. siamea* dalam melengkapi data praklinis suatu produk fitofarmaka atau sediaan obat bahan alam yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinik dan uji klinik, bahan baku dan produk jadinya telah di standarisasi (BPOM, 2005).

Seperti diketahui bahwa hambatan utama dalam pemanfaatan tanaman obat adalah adanya ketidakpercayaan begitu saja dari sebagian kalangan dokter

terhadap efektivitas dan keamanan obat tradisional. Hal ini wajar karena penggunaan obat tradisional hanya berdasarkan pengalaman atau empiri secara turun temurun dan sedikit memiliki landasan ilmiah. Untuk dapat digunakan secara luas oleh seluruh masyarakat maka sediaan dari bahan alam harus mempunyai efficacy dan safety yang jelas sebelum dipasarkan. Untuk itu maka dilakukan suatu uji toksisitas terhadap daun *C. siamea* sehingga dapat diketahui keamanan dalam penggunaannya ditinjau dari segi toksikologi dan efek yang tidak dikehendaki.

Manusia lebih sering terpajan zat kimia dengan dosis yang jauh lebih rendah daripada dosis yang menyebabkan kematian. Tetapi pajanan itu biasanya jauh lebih lama. Untuk menilai efek toksik dalam situasi yang lebih realistik ini, dilakukan penelitian jangka pendek melalui uji toksistas subkronik dan jangka panjang melalui uji toksistas kronik (Lu, 1995). Uji toksisitas subkronik dapat mengevaluasi dan menggolongkan efek toksikan bila diberikan dalam dosis tertentu secara berulang-ulang selama tiga sampai empat bulan (Loomis, 1978). Uji toksisitas subkronik dilakukan karena meskipun data uji toksisitas akut menunjukkan hasil yang relatif tidak toksik, tetapi dalam pemberian berulang belum tentu tidak akan menimbulkan efek toksik. Hal ini disebabkan adanya efek kumulatif, perubahan enzim dan mekanisme lain (PPOM, 1991).

Alkaloid merupakan salah satu metabolit sekunder pada tanaman. Alkaloid banyak dimanfaatkan sebagai bahan obat. Namun alkaloid juga memiliki sifat toksik bagi tubuh diantaranya menyebabkan reduksi pada *tuba faloppi* sehingga menyebabkan infertilitas. Selain itu, alkaloid juga menyebabkan pengkerutan membran sel sehingga fungsi fisiologis membran sel terganggu. Alkaloid jenis pirolyzidin bersifat hepatotoksik sementara jenis vincristin dan vinblastin menyebabkan penurunan sel darah putih. Tanaman *C. siamea* mengandung alkaloid inti isokuinolin, yaitu siaminin. Alkaloid golongan isokuinolin ini menyebabkan iritasi pada mukosa saluran pencernaan (Newall, 1996).

Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa ekstrak etanol 70% daun *C. siamea* tergolong tidak toksik. Pada penelitian kali ini dipakai fraksi etilasetat daun *C. siamea* karena berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kurniawan (2006), fraksi etilasetat daun *C. siamea* memiliki kemampuan dalam

menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit dengan hasil ED₅₀ sebesar 0,56 mg/kg BB mencit sedangkan Nugroho (2006) memperoleh harga ED₈₀ sebesar 40,3796 mg/kg BB. Pada penelitian sebelumnya telah pula diketahui LD₅₀ (*Median Lehtal Dose*) sebesar 16,57 g/kg BB mencit.

Uji toksisitas subkronik fraksi etilasetat daun *C. siamea* dilakukan pada tikus putih (*Ratus novergicus*) jantan selama tigapuluh hari. Alasan digunakan etilasetat karena selain etilasetat juga merupakan pelarut organik semipolar, etilasetat tidak bersifat karsinogenik seperti pada kloroform, sehingga etilasetat dapat digunakan sebagai pelarut dalam pembuatan sediaan obat herbal terstandar atau produk fitofarmaka antimalaria dari daun *C. siamea*.

Tujuan dilakukannya uji toksisitas ini adalah untuk mengetahui efek fraksi etilasetat daun *C. siamea* apabila digunakan dalam jangka panjang terhadap darah tikus putih jantan. Uji toksisitas terhadap fraksi etilasetat daun *C. siamea* dilakukan selama tigapuluh hari dengan tujuan untuk mengetahui efek penggunaannya dalam jangka panjang dan pengaruhnya terhadap darah tikus putih (*R. novergicus*) jantan.

Bagian yang diamati dalam uji toksisitas subkronik ini adalah darah, dimana darah merupakan komponen tubuh yang berperan penting dalam sirkulasi, distribusi, maupun pertahanan tubuh dari infeksi. Nilai komponen-komponen penyusun darah dapat menjadi indikator ada tidaknya penyakit atau kelainan fungsi organ tertentu melalui serangkaian pengamatan di laboratorium. Dalam hal ini komponen-komponen darah yang diamati antara lain SGOT, SGPT, dan protein total yang menjadi indikator fungsi hepar sebagai organ pemetabolisme dan detoksifikasi. Selain itu juga diamati kreatinin serum dan BUN yang menjadi indikator fungsi ginjal.

Uji toksisitas dilakukan dengan mengamati jumlah komponen penyusun darah baik itu plasma maupun serum pada tikus putih (*R. novergicus*) jantan galur wistar yang diberi fraksi etilasetat daun *C. siamea* secara oral dalam dosis tertentu sehari satu kali selama tigapuluh hari. Apabila muncul efek toksik, hal ini kemungkinan dapat disebabkan dari metabolit sekunder yang dihasilkan dari hasil akhir metabolisme suatu tanaman, bahan obat tanaman, lama penggunaan, atau penggunaan dosis yang terlalu tinggi.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah fraksi etilasetat daun *C. siamea* yang diberikan secara per oral dalam dosis tertentu selama tigapuluh hari tidak menimbulkan perubahan atau efek toksik pada darah tikus putih (*R. norvegicus*) jantan ?

1.3 Tujuan Penelitian

Uji toksisitas subkronik yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui perubahan atau efek toksik akibat pemberian fraksi etilasetat daun *C. siamea* terhadap darah tikus putih (*R. norvegicus*) jantan secara per oral.

1.4 Hipotesis

Fraksi etilasetat daun *C. siamea* yang diberikan pada tikus putih jantan secara per oral dalam dosis tertentu selama tigapuluh hari tidak menimbulkan perubahan atau efek toksik terhadap darah tikus putih jantan (dibandingkan dengan kontrol negatif).

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai toksisitas subkronik pada penggunaan fraksi etilasetat daun *C. siamea* dan dapat digunakan sebagai data praklinik guna pengembangan menjadi fitofarmaka .

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Tanaman *Cassia siamea*

2.1.1. Klasifikasi Tanaman (Becker C.A and Backhuizen, 1963)

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Anak kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Leguminosae
Suku	: Caesalpiniaceae
Marga	: <i>Cassia</i>
Jenis	: <i>Cassia siamea</i> Lamk
Nama daerah	: Johar, Juwar (Heyne, 1987)
Sinonim	: <i>Cassia florida</i> Vahl., <i>Senna sumatrana</i> Roxb.; <i>Cassia arayatensis</i> Naves (Joker, 2001)

2.1.2. Penyebaran *Cassia siamea*

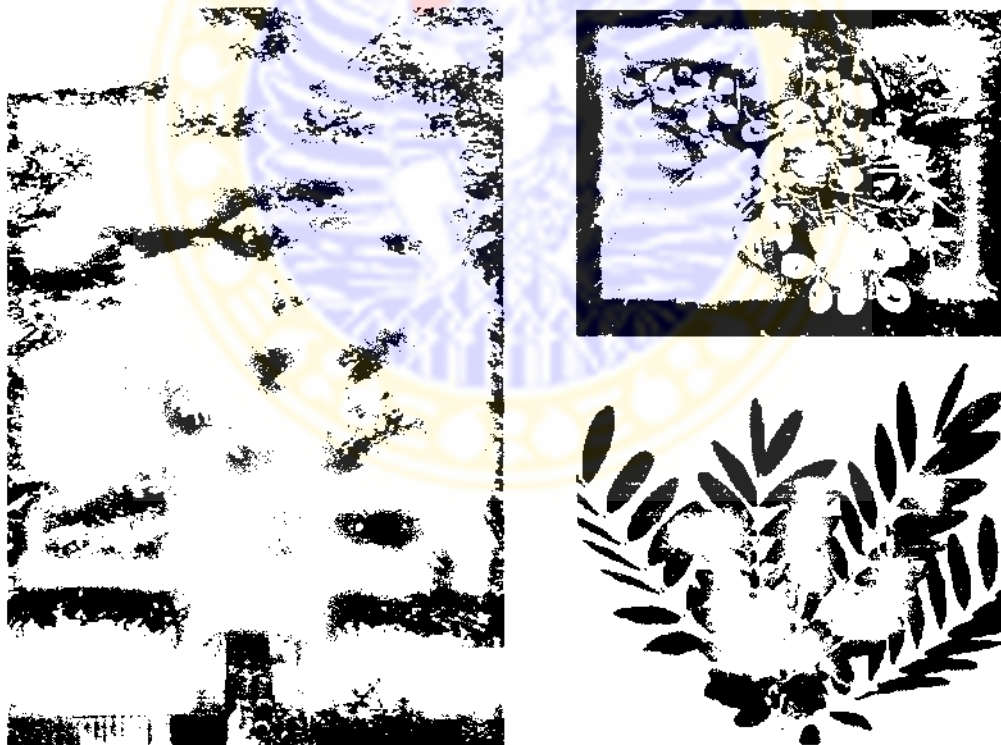
C. siamea merupakan tanaman asli India dan Sumatera sekitar khatulistiwa. Tanaman ini merupakan salah satu jenis pohon yang banyak dibudidayakan di Pulau Jawa. Tanaman ini banyak terdapat di sepanjang jalan sebagai pohon peneduh. Tanaman ini mampu tumbuh pada ketinggian kurang lebih 1000 m di atas permukaan laut dan tidak memerlukan kondisi tanah yang terlalu baik.

Di daerah Batak sering ditemukan *C. siamea* dalam hutan sekunder yang berumur puluhan tahun dan tumbuh dengan baik. Di daerah pantai barat Sumatra, bagian kayu dari *C. siamea* merupakan jenis kayu yang sangat keras (Heyne, 1987)

2.1.3. Morfologi *Cassia siamea*

Merupakan tanaman pohon (keras) menahun, berbatang tegak dan banyak bercabang. Tanaman ini dapat mencapai tinggi hingga 20 m, batangnya berbentuk bulat, berkayu keras dan daunnya berbentuk menyirip genap. Anak daun berbentuk oval sampai memanjang seringkali melekuk ke dalam, pada bagian bawah berambut halus dan tepi daun rata. Ukuran anak daun panjangnya 3 - 7,5 cm dan lebarnya 1 - 2,5 cm. Bunga berbentuk malai, Kelopak bunga terbagi lima, daun mahkota berwarna kuning cerah panjangnya 2 cm, tangkai sari terpanjang 1 cm.

Buah berbentuk polongan dengan katup yang tebal dan sambungan buah yang dapat dipertebal, diantara sambungan berkelok-kelok panjangnya 15 - 30 cm lebarnya 1,5 cm berkatup dua dan berisi biji antara 20 - 30 butir dan panjangnya 1,5 kali panjang. (Mardisiswo dan Rajakmangunsudiarso, 1985).



Gambar 2.1 Pohon, Bunga dan Daun *C. siamea*

2.1.4. Kandungan *Cassia siamea*

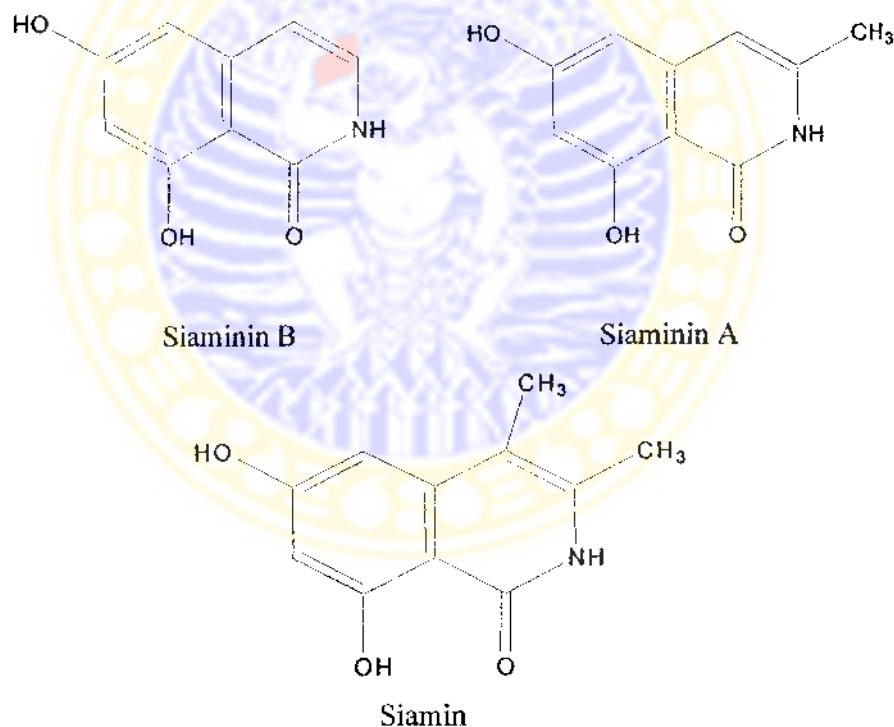
Kandungan senyawa kimia yang terdapat pada tanaman *C. siamea* antara lain : (Depkes RI, 1989; Ross, S.A, 1986; Rao *et al.*,1978)

Pada daun : Triterpenoid, alkaloid inti isokuinolin, yaitu siaminin, Senyawa golongan antrakuinon (dioxapenalen, krisofanolantron), sitosterol, flavonoid barakol, apigenin, kaempferol

Pada kayu/ batang : Tannin, antrakuinon, lignin, pentosa hidrosianat

Pada bunga : Senyawa alkaloid inti kromon, yaitu Cassia Denindihidroisokumarin asam kumarat, sterol

Pada buah : Antrakuinon, krisopanol (Abdallah *et al.*, 1987)



Gambar 2.2 Struktur senyawa alkaloid Isokuinolina dari daun *C. siamea* (El-Sayyed SM, 1984)

2.1.5. Khasiat *Cassia siamea* (Heyne, 1987)

C. siamea mempunyai berbagai macam khasiat dan dapat digolongkan menurut bagian tanaman yang digunakan antara lain :

1. Daun *C. siamea* digunakan secara tradisional oleh masyarakat Jawa sebagai antimalaria. Disamping itu juga dapat digunakan untuk menghilangkan gatal-gatal dan penyakit kulit.
2. Akarnya dapat digunakan sebagai obat cacing
3. Bunga dan buahnya dipakai sebagai tonikum

2.2 Tinjauan Tentang Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut, seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Simplisia yang lunak seperti rimpang dan daun mudah diserap oleh pelarut, karena itu pada proses ekstraksi tidak perlu diserbuk sampai halus. Ada beberapa macam metode ekstraksi yang dapat digunakan, antara lain :

A. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut

1. Cara dingin.

- Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.

- **Perkolasi**

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/ penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

2. Cara panas

- **Refluks**

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur pada titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstant dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.

- **Soxhlet**

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

- **Digesti**

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinyu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yang secara umum dilakukan pada temperatur 40-50⁰C.

- **Infus**

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air bejana infus tercelup ke dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98⁰C) selama waktu tertentu (15- 20 menit).

- **Dekok**

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ($\geq 30^0$ C) dan temperatur sampai titik didih air.

B. Destilasi uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan partial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dan

ketel secara kontinyu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama sentawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian.

Pada destilasi uap, bahan (simplisia) benar-benar tidak tercelup ke air yang mendidih, namun dilewati uap air sehingga senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi. Bahan (simplisia) bercampur sempurna atau sebagian dengan uap air.

C. Cara ekstraksi lainnya.

- **Ekstraksi berkesinambungan**

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi.

- **Superkritikal karbondioksida**

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia, dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variabel temperatur dan tekanan akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak.

- **Ekstraksi ultrasonik**

Getaran ultrasonik (>20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (cavitation) sebagai stress dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekwensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi.

- **Ekstraksi energi listrik**

Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta "electric-discharges" yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelembung tekanan berkecepatan ultrasonik.

2.4 Tinjauan Tentang Uji Toksisitas

Uji toksisitas adalah suatu uji untuk mendeteksi efek toksik dari suatu zat uji (toksikan) pada sistem biologi dan untuk memperoleh data respon yang khas akibat pemberian zat uji (toksikan) tersebut. Penelitian toksisitas secara konvensional yang dilakukan terhadap hewan coba mengungkap serangkaian efek akibat pemberian toksikan dalam berbagai dosis untuk berbagai masa pemberian. Oleh karena itu, penelitian ini merupakan sumber data utama dalam evaluasi toksikologi.

Uji toksisitas dibagi menjadi dua kelompok, yaitu uji toksisitas umum dan uji toksisitas khusus / spesifik. Uji toksisitas umum meliputi toksisitas akut, subkronis dan kronis sedangkan uji toksisitas khusus antara lain uji teratogenitas, karsinogenitas, mutagenesis, uji kulit dan mata, serta uji perilaku. Manfaat uji Toksisitas antara lain :

1. Untuk mengetahui gejala – gejala yang mungkin timbul akibat pemberian. Obat
2. Untuk mengetahui batas keamanan suatu obat
3. Untuk mengetahui derajat kematian hewan coba akibat pemberian obat.
4. Untuk mengetahui organ sasaran (misalnya hati), sistem (misalnya sistem kardiovaskuler), toksisitas khusus (misalnya karsinogenik) yang membutuhkan penelitian lebih lanjut (Loomis, 1978).

2.4.1 Uji toksisitas akut

Uji toksisitas akut dirancang untuk menentukan peringkat letalitas toksikan. Hasil dari uji toksisitas ini adalah dosis lethal median (LD_{50}), yaitu dosis tunggal suatu zat yang diharapkan akan membunuh 50% hewan coba. Selain itu, uji ini juga dapat menunjukkan organ sasaran yang mungkin dirusak dan efek toksik spesifiknya terhadap organ tersebut, serta memberikan petunjuk tentang dosis yang sebaiknya digunakan dalam pengujian yang lebih lama (Lu, 1995). Pada uji ini, toksikan diberikan dalam dosis tunggal dalam waktu 24 jam.

Prinsip uji toksisitas akut yaitu toksikan pada beberapa tingkat dosis diberikan pada beberapa kelompok hewan coba, satu tingkat dosis tiap kelompok. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap efek toksik dan kematian. Hewan-

hewan tersebut diamati selama 24 jam. Apabila hewan-hewan tersebut masih tampak sehat pada akhir masa 24 jam tersebut, maka mereka disisihkan dan diamati sebagai antisipasi kemungkinan munculnya toksisitas yang tertunda (Loomis, 1978).

2.4.2 Uji toksisitas subkronik

Uji toksisitas sub akut dilakukan untuk mendeteksi adanya respon toksik setelah pemberian toksikan secara berulang dalam dosis tertentu selama lebih kurang 10% masa hidup hewan coba. Uji toksisitas subkronik dilakukan dengan memberikan toksikan pada beberapa tingkat dosis. Karena tujuan penelitian ini adalah menentukan sifat dan tempat efek toksik disamping menentukan "kadar tanpa efek" (*no effect level*), disarankan untuk memilih tiga dosis : Satu dosis cukup tinggi untuk menimbulkan tanda toksisitas yang pasti tetapi tidak cukup tinggi untuk membunuh sebagian besar hewan, dosis rendah yang diharapkan tidak akan memberikan efek toksik sama sekali, dan dosis menengah (Lu, 1995)

Dalam penelitian biasanya dipakai: 5; 10 kali Dosis Lazim, pada beberapa kelompok hewan coba, satu tingkat dosis tiap kelompok. Pemberian dilakukan berulang-ulang dan dalam interval pemberian tertentu, biasanya sekali sehari, selama jangka waktu kurang lebih 10% dari masa hidup hewan (tiga bulan untuk tikus dan satu atau dua tahun untuk anjing). Meskipun demikian, beberapa peneliti menggunakan jangka waktu yang lebih pendek (14 dan 28 hari). Pengamatan yang perlu dilakuakn pada uji toksisitas subakut antara lain :

a. Berat badan dan konsumsi Makanan.

Kedua hal tersebut harus diukur tiap minggu. Berkurangnya pertambahan berat badan merupakan indeks efek toksik yang sederhana namun sensitif. Konsumsi makann yang berkurang juga bisa menimbulkan efek yang mirip atau memperberat efek toksik zat tersebut.

b. Pengamatan Umum

Yang harus diamati adalah penempilan, perilaku, dan semua abnormalitas. Hewan yang mati atau sakit harus dipisahkan dari kandang untuk diperiksa secara umum (makroskopik) dan kalau mungkin secara mikroskopik.

c. Uji Laboratorium

Pemeriksaan hematologik biasanya mencakup : hematokrit, hemoglobin, hitung eritrosit, hitung leukosit total, hitung jenis leukosit. Uji khusus misalnya : hitung retinokulosit, hitung trombosit, pengukuran methenoglobin, dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase. Uji laboratorium klinik mencakup: glukosa darah puasa, transaminase sam glutamat oksaloasetat (SGOT), trasaminase asam glutamat piruvat (SGPT), fosfatase alkalin, protein total, albumin, globulin, nitrogen urea darah (BUN), dan unsur-unsur seperti natrium, kalium, kalsium, dan klorida. Urinalisis mencakup : warna, berat jenis, pH, protein, glukosa, keton, unsur berbentuk (sel darah merah, dll) dan kristal serta bentuk amorf.

d. Pemeriksaan Pascamati

Bila mungkin, semua hewan yang mati atau sekarat diperiksa patologiknya secara makroskopis (Lu, 1995).

Tabel II.1. Pengamatan umum, uji laboratorium klinik, dan pemeriksaan patologi yang mungkin digunakan dalam penelitian toksisitas subkronik

Organ atau organ sisitem	Pengamatan Umum	Uji laboratorium klinik pada darah	Pemeriksaan Patologi*
Hati	Perubahan warna membrane mukosa, edeme, asies	Transminase glutamate Oksaloasetat (GOT), transaminase glutamate piruvat (GPT), Fosfatase Alkaline (AP), Kolesterol, Protein total, albumin,	Hati [†]

		globulin	
Sistem saluran cerna	Diare, Muntah, tinja, nafsu makan	Protein total, albumin, globulin, natrium, kalium	Lambung, saluran cerna, kandung empedu (kalau ada), kelenjar ludah, pankreas
Sistem kemih	Volume urine, konsistensi, warna	Nitrogen urca darah, protein total, albumin, globulin	Ginjal dan kandung kemih ^t
System hematopoietik	Perubahan warna membrane mukosa, letargi, kelemahan	Volume sel darah merah, hemoglobin, hitung eritrosit, hitung leukosit total dan hitung jenis, hitung trombosit, apus darah, waktu protombin, waktu tromboplastin parsial teraktivasi (APTT)	Limpa, timus, kelenjar limf mesentrik, apus potongan sumsum tulang
Sistem saraf	Sikap tubuh, gerakan, respon, perilaku		Otak, sumsum tulang belakang, dan syaraf siatika
Mata	Penampilan, tahi mata pemeriksaan oftalmologik		Mata dan syaraf optik
Sistem pernafasan	Frekuensi nafas, batuk, ingus	Protein total, albumin, globulin	Satu paru dengan satu bronkus yang

			besar
Sitem endokrin	Kulit, bulu, berat badan, sifat urin dan tinja	Gukosa, Na, K, AP (anjing) kolesterol	Tiroid, adrenal, pankreas
Sistem reproduksi	Penampilan dan palpasi alat reproduksi luar		Testis dan epididimis atau ovarium. Uterus tau prostat dan vesikula seminalis ^t
Sistem skelet	Pertumbuha, deformasi, kelumpuhan	Kalsium, fosfor, AP	Tulang dan kekuatan menahan patah
Sistem kardiovaskuler	Frekuensi dan sifat nadi, irama edema, asites	GOT	Jantung ^t , aorta, arteri kecil di jaringan lain
Kulit	Warna, penampilan, bau, bulu	Protein total, albumin, globulin	Hanya dalam penelitian dermal
Otot	Ukuran, kelemahan, pengecilan, berkurangnya aktivitas	GOT, kreatinin fosfokinase	Hanya bila ada indikasi dari pengamatan kimia klinik, atau lesi yang nyata

(Sumber : Workshop on subchronic Toxicity Testing, 1980)

- semua hewan harus menjalani pemeriksaan umum yang teliti; organ dan jaringan yang dicantumkan.
- ^t organ ini juga harus ditimbang (Lu, 1995).

2.4.3. Uji toksisitas kronik

Prinsip dari uji toksisitas kronik ini hampir sama dengan uji toksisitas sub kronik. Perbedaan hanya terletak pada lama waktu pemberian yang biasanya

melebihi satu tahun bahkan sampai hewan tersebut mati. Tujuan dari uji ini adalah untuk memaparkan ada tidaknya toksisitas bila dosis tersebut mewakili satu tingkat dosis lazim dan untuk memaparkan ada tidaknya potensial karsinogenik suatu senyawa (Loomis, 1978).

2.4.4. Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Toksisitas

Berbagai faktor dapat memacu timbulnya toksisitas, antara lain :

1. Spesies dan Keturunan

Perbedaan spesies dan keturunan menyebabkan perbedaan kerentanan terhadap bahan kimia, kecepatan absorpsi, metabolisme, detoksifikasi dan ekskresi.

2. Umur

Untuk beberapa obat, umur memberi efek toksisitas secara bermakna terutama kemampuan dalam proses metabolisme dan ekskresi

3. Status Gizi

Status gizi berpengaruh terhadap mekanisme biotransformasi yang secara langsung dapat memacu timbulnya toksisitas. Timbulnya toksisitas lebih besar lagi dapat dipengaruhi oleh pengosongan lambung dan absorpsi oleh usus halus.

4. Faktor Lingkungan

Keseragaman faktor lingkungan berpengaruh terhadap perkembangan toksisitas, termasuk temperatur, kelembapan relatif dan intensitas cahaya.

5. Dosis

Pemberian obat secara berulang, walaupun dengan dosis yang kecil dapat menimbulkan toksisitas.

6. Formulasi

Bahan-bahan kimia yang diberikan secara peroral atau secara topikal, toksisitasnya dapat dipacu oleh keberadaan bahan-bahan yang dapat meningkatkan atau memperlambat absorpsi. Pada bentuk sediaan aerosol, ukuran partikel dapat meningkatkan penetrasi dan deposisi bahan kimia jalur pernafasan, oleh karena itu dosis yang digunakan harus benar-benar tepat.

7. Lain-lain

Faktor-faktor lain yang dapat menimbulkan toksisitas tergantung dari kondisi percobaan. Misalnya : kondisi tempat dan perlakuan. Perbedaan kondisi dan prosedur dapat memberikan hasil yang berlawanan dengan prosedur standar.

2.5. Tinjauan tentang hewan coba

Pada prinsipnya, jenis hewan yang digunakan dalam uji toksisitas harus mempertimbangkan sensitivitas, cara metabolisme zat uji serupa dengan manusia, kecepatan tumbuh, serta mudah tidaknya cara pembiakan dan penanganan, serta banyaknya informasi toksikologi berbagai zat kimia pada hewan tersebut (Lu, 1995). Hewan pengerat merupakan hewan yang memenuhi persyaratan tersebut sehingga paling banyak digunakan. Hewan yang digunakan harus sehat, asal jenis hewan diketahui, jenis kelamin; usia; dan bobot tubuh harus jelas dan seragam. Dalam satu kelompok dosis, hewan jantan dan betina harus sama jumlahnya. Biasanya digunakan hewan muda dewasa. Bobot tubuh untuk masing-masing hewan pada setiap percobaan tidak berbeda lebih dari 20% (PPOM, 1991).

2.5.2 Tinjauan Tentang *Ratus norvegicus*

R. Norvegicus terdiri dari Outbred Strains dan Inbred Strains, namun yang biasa digunakan pada penelitian jenis Outbred. Outbred terdiri dari beberapa galur : Wistar (tikus albino), Sprague-Dawley (tikus albino-pertumbuhannya lebih cepat dari Wistar), Long-Evans (tikus berkerudung-lebih kecil dari Wistar atau Sprague-Dawley). Inbred terdiri dari : galur Ficher 344 dan Lewis.

Tikus dapat menunjukkan secara alami terjadinya berbagai penyakit seperti hipertensi dan diabetes yang membuatnya digunakan dalam penelitian pada penyakit-penyakit tertentu yang dapat diaplikasikan pada manusia. Tikus ini juga sering digunakan pada penelitian tentang perilaku, nutrisi, toksikologi, dan obat.

Data Fisik dari *R. norvegicus* antara lain :

- temperatur tubuh : 35,9-37,5°C
- *heart rate* : 250-600/ menit
- *respiration rate* : 66-144/ menit
- berat badan (BB): jantan dewasa : 300-500 gram, betina dewasa : 200-400 gram, bayi : 5 gram

- konsumsi air : 24-60 mL/ hari atau 10-12 mL/ 100 kg BB tiap hari
- konsumsi makanan : 15-30 gram/hari atau 5-6 gram/ 100 gram BB
- feces : kaku, coklat gelap, memanjang dengan ujung bundar
- urine : jernih kuning;
- umur : 2,5 – 3,5 tahun.

2.5.3 Klasifikasi Hewan

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Class	: Mammalia
Order	: Rodentia
Family	: Muridae
Subfamily	: Murinae
Genus	: Ratus
Species	: <i>Ratus novergicus</i>



Gambar 2.2 Tikus putih (*R. novergicus*)

2.6. Tinjauan tentang darah

Darah merupakan suspensi partikel dalam larutan koloid cair yang mengandung elektrolit. Darah beredar dalam suatu sistem pembuluh darah yang pada hakekatnya tertutup. Darah berperan sebagai medium pertukaran antar sel yang terfiksasi dalam tubuh dan lingkungan luar serta memiliki sifat-sifat protektif

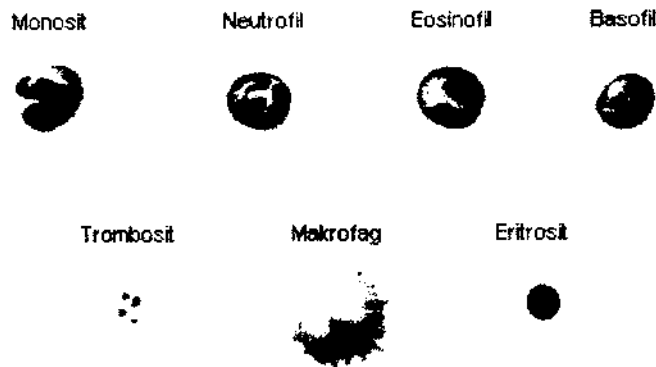
terhadap organisme sebagai suatu keseluruhan dan khususnya terhadap darah sendiri. Fungsi utama darah antara lain :

1. Pengangkutan oksigen dari paru-paru ke jaringan dan pengangkutan karbondioksida dari jaringan ke paru-paru.
2. Pengangkutan bahan makanan , hormon, metabolit.
3. Pertahanan tubuh terhadap infeksi
4. Pengaturan suhu tubuh melalui distribusi panas tubuh
5. Mempertahankan keseimbangan asam-basa dan keseimbangan air-elektrolit dalam tubuh
6. Koagulasi atau pembekuan darah bila terjadi perdarahan (Harper, 2003).

Komponen cair darah yang disebut plasma terdiri dari 91-92% air yang berperan sebagai medium transpor, dan 7-9% terdiri dari zat padat. Zat-zat padat itu adalah protein-protein seperti albumin, globulin dan fibrinogen; unsur anorganik berupa natrium, kalsium, kalium, fosfor, besi dan iodium; unsur organik berupa zat-zat nitrogen non protein, urea, asam urat, xantin, kreatinin, asam amino, lemak netral, fosfolipid, kolesterol, glukosa dan berbagai enzim seperti amilase, protease dan lipase. Setelah fibrinogen dan faktor-faktor pembekuan dihilangkan dari plasma, tinggalah serum (Wilson and Price, 1995).

Semua sel darah dibuat di sumsum tulang. Beberapa obat dan penyakit dapat merusak sumsum tulang sehingga mengganggu proses pembentukan sel darah. Obat-obatan seperti antituberkolosis (INH, sikloserin, pirazinamid) , kloramfenikol dan etanol menyebabkan *anemia sideroblastik* (Supandiman, 2001).

Penelitian tentang sel darah telah dilaksanakan secara intensif karena sel darah mudah diperoleh, memiliki makna fungsional yang penting dan terlibat dalam berbagai proses penyakit.



Gambar 2.3 Bentuk sel-sel darah (sumber:medicastore.com)

2.6.1 Tinjauan tentang eritrosit

Eritrosit atau sel darah merah memiliki bentuk cakram bikonkaf, yang tidak berinti, diameter 8 μm , tebal bagian tepi 2 μm dan bagian tengah 1 μm . Karena sifatnya yang lunak dan lentur maka dalam perjalanannya melalui mikrosirkulasi konfigurasinya berubah. Bagian luar mengandung antigen kelompok A dan B serta faktor Rh yang menentukan golongan darah seseorang. Komponen utama eritrosit adalah hemoglobin yang mengangkut O_2 dan CO_2 serta mempertahankan pH normal melalui serangkaian dapar intraselular. Jumlah rata-rata eritrosit normal pada orang dewasa kira-kira $5 \times 10^6/\text{mm}^3$ darah, sedangkan pada tikus 7.0×10^6 - $9.7 \times 10^6/\text{mm}^3$ darah (Baker *et al*, 1979). Orang yang berada di dataran tinggi memiliki jumlah eritrosit yang lebih banyak, hal ini merupakan salah satu bentuk kompensasi tubuh untuk mengatasi kekurangan oksigen. Kadar hemoglobin dalam darah manusia normal berkisar 14-18 g/dL pada pria dan 12-16 g/dL pada wanita (Harper, 2003). Pada tikus normal, kadar hemoglobin 11.4-19.2 g/dL (Baker *et al*, 1979)

2.6.2 Tinjauan tentang leukosit

Leukosit atau sel darah putih memiliki jumlah yang lebih sedikit dibanding eritrosit, dengan perbandingan sekitar 1 leukosit untuk 660 eritrosit. Jumlah leukosit pada manusia normal berkisar 4000 - $10000/\text{mm}^3$ darah, sedangkan

pada tikus berkisar 6000-18000/mm³ darah. Leukosit memiliki peranan utama dalam melawan infeksi. Terdapat 5 jenis utama dari Leukosit, yang bekerja sama membangun mekanisme utama tubuh dalam melawan infeksi termasuk membentuk antibodi. *Netrofil* (55% dari total jumlah leukosit) berperan dalam mencerna benda-benda asing dan melawan infeksi jamur maupun bakteri. Netrofil dibagi dalam dua bentuk, yaitu bentuk yang matur dan immatur. *Eosinofil* (1-2%) berperan dalam respon alergi, membunuh parasit dan merusak sel kanker. *Basofil* (0.5-1%) berperan dalam respon alergi jangka panjang. *Monosit* (4%) bertugas mencerna sel-sel yang mati atau rusak serta memberikan perlawanan immunologis. *Limfosit* (36%) memiliki dua bentuk utama, yaitu *limfosit T* yang berperan melindungi dari infeksi virus serta menemukan dan merusak sel kanker dan *limfosit G*. Yang berperan membentuk sel yang menghasilkan antibodi. *Netrofil*, *eosinofil* dan *basofil* termasuk dalam kelompok *granulosit* artinya memiliki granula dalam sitoplasma. Diameter granulosit berkisar antara 10-14 um (Guyton, 1991).

2.6.3 Tinjauan tentang Trombosit

Trombosit merupakan komponen darah yang berperan dalam proses pembekuan darah. Trombosit dan faktor pembekuan lain seperti faktor II, VII, IX, X disintesis di hepar. Adanya kerusakan hepar dapat menurunkan sintesis faktor pembekuan yang berakibat darah sukar membeku jika terjadi perdarahan. Obat-obatan seperti *Aspirin* (asam asetilsalisilat) merupakan preparat antitrombosit yang efektif yang bekerja dengan cara menghambat produksi tromboksan A₂. Tes fungsi trombosit meliputi hitung jumlah trombosit dan waktu perdarahan

2.6.4 Tinjauan tentang SGOT dan SGPT

Aspartat amino transferase (AST) atau serum glutamic oxaloasetic transaminase (SGOT) dan alanin amino transferase (ALT) atau serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) merupakan enzim-enzim intraselular yang berada di jantung, hepar, dan jaringan skelet. Zat ini terlepas dan masuk ke peredaran darah jika jaringan mengalami kerusakan, nekrosis atau terjadinya perubahan

permeabilitas sel. Enzim ini biasa dipakai untuk diagnosa dini dari viral hepatitis. Pada keadaan obstruksi ikterus, tumor hepar, primer maupun sekunder, kadar enzim ini dalam plasma naik 50-100 unit (Guyton, 1991). Jumlah zat ini meningkat pada kerusakan sel hepar dan infark miokardial.

Kadar SGOT pada manusia dewasa normal berkisar 5-40 unit/mL dan kadar SGPT berkisar 5-35 unit/mL. (Harper, 2003). Sedangkan pada tikus dewasa normal, kadar SGOT berkisar 45.7-80.8 unit/L dan kadar SGPT 17.5-30.2 unit/L (Semler, 1990). Namun nilai tersebut masih perlu dibandingkan dengan kontrol negatif. Rasio SGPT/SGOT merupakan salah satu indikator terjadinya kerusakan hepar kronik maupun akut.

2.6.5 Tinjauan tentang BUN (Blood Ureum Nitrogen)

Hampir seluruh urea dibentuk di hepar. Hepar mengubah NH_3 yang berasal dari metabolisme protein menjadi urea yang diekskresi lewat renal. Kadar urea-nitrogen darah manusia normal 8-25 mg/dL (Harper, 2003) sedangkan pada tikus normal berkisar 15-22 mg/dL (Baker *et al*, 1979). Pada keadaan payah hepatoselular maupun pintas portal sistemik yang besar, kemampuan hepar untuk mengubah NH_3 menjadi urea menurun. Akibatnya kadar NH_3 darah meningkat dari kadar normalnya (Wilson and Price, 1995)

2.6.6 Tinjauan tentang kreatinin

Kreatinin merupakan produk sisa yang utama dari metabolisme kreatin oleh otot. Kreatinin bebas berada dalam darah dan bisa berdifusi secara bebas antara sel dan air plasma. Kreatinin difiltrasi oleh glomerulus dan di ekskresi secara aktif oleh tubulus. Meningkatnya kadar kreatin dalam darah merupakan indikator rusaknya ginjal. Pada kegagalan ginjal, kreatinin ditahan bersama unsur non nitrogen protein darah. Bersihan kreatinin merupakan salah satu cara pengujian fungsi faal ginjal. Kadar kreatinin dalam darah manusia normal berkisar antara 0.7-1.5 mg/dL (Harper, 2003), sedangkan pada darah tikus normal berkisar antara 0.4-1.5 mg/ dL (Baker *et al*, 1979).

2.6.7 Tinjauan tentang protein serum total

Protein serum antara lain terdiri dari *Albumin* dan *Globulin*. Sebagian besar protein serum disintesis di hepar. Pada bayi, jumlah albumin lebih rendah dibanding orang dewasa (Baron, 1991). Konsentrasi protein tersebut sangat penting untuk menentukan distribusi cairan antara darah dan jaringan. Berkurangnya jumlah albumin dapat menyebabkan *edema*. Hal ini dikarenakan cairan tidak ditarik kembali dalam intravaskular tetapi tertimbun dalam ruang jaringan ekstrasvaskular. Edema sering tampak pada penderita sirosis hepatic akibat sintesis protein oleh hepar terganggu. Selain itu, adanya abnormalitas pada glomerulus ginjal dapat menyebabkan albumin keluar melalui ginjal dalam jumlah besar (*albuminuria*) sehingga darah kekurangan albumin (*hipoalbuminemia*) dan terjadi pembalikan perbandingan albumin-globulin (Sudiono *et al* ,2003). Jumlah normal protein serum total pada manusia berkisar 6-8 g/dL (Harper, 1991), sedangkan pada tikus normal berkisar 6.0-7.8 g/dL (Baker *et al*, 1979).

2.6.8 Tinjauan tentang glukosa darah

Istilah gula darah pada umumnya digunakan untuk glukosa yang terdapat dalam darah. Sel hepar yang dapat dilewati glukosa dengan bebas merupakan sarana untuk mengatur konsentrasi glukosa dalam plasma karena mengandung enzim glukokinase. Hormon insulin yang disekresi oleh pankreas membantu hepar menyimpan glukosa dalam bentuk glikogen dan memfasilitasi pengambilan glukosa oleh jaringan ekstrahepatik. Kadar glukosa darah pada tikus normal berkisar 98- 152 mg/dL (Baker *et al*,1979).

2.6.9 Istilah dalam pengukuran.

Hitung sel darah adalah jumlah sebenarnya dari unsur darah , yaitu eritrosit, leukosit, dan trombosit. Eritrosit harus dilisiskan sebelum leukosit dapat dihitung. Jumlah ini biasanya dinyatakan sebagai jumlah sel per milimeter kubik (mm^3), tetapi dapat juga dinyatakan dalam jumlah sel per liter seperti yang direkomendasikan oleh International Committee of Standardization of Hematology. Jumlah sel yang tidak normal mencerminkan ada atau tidaknya respon tubuh

terhadap proses proses tertentu. *Hitung jenis sel darah* menentukan karakteristik morfologis darah maupun jumlah berbagai sel darah (Wilson dan Price, 1995).

Tabel II.2. Jumlah komponen-komponen darah tikus normal (Baker *et al*, 1979)

No	Komponen darah	jumlah normal
1	eritrosit	$7 \times 10^6 - 9 \times 10^6 / \text{mm}^3$
2	hemoglobin	11.4-19.2 g/dL
3	leukosit	6000-18000/mm ³
4	trombosit	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6 / \text{mm}^3$
5	SGOT	45.0-80.8 u/L
6	SGPT	17.5-30.2 u/L
7	BUN	15-22 mg/dL
8	Kreatinin	0.4-1.5 mg/dL
9	Total protein	6.0-7.8 g/dL
10	Gula darah	98-152 mg/dL

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

Ada beberapa keuntungan pengobatan dengan bahan alam atau fitoterapi. Keuntungan yang utama adalah ketersediaan bahan alam dalam jumlah yang cukup besar terutama di negara-negara berkembang. Di samping itu, obat dari bahan alam dalam hal ini obat tradisional lebih dipercaya dan digunakan oleh sebagian besar penduduk dunia terutama di negara-negara berkembang. Efek samping dari obat bahan alam juga relatif lebih ringan dan dari segi ekonomis relatif lebih murah (Wijisekera, 1991)

C. siamea yang dikenal dengan nama Johar, merupakan salah satu jenis tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Salah satu khasiat dari tanaman ini yaitu sebagai obat anti malaria. Penggunaan daun *C. siamea* sebagai obat anti malaria telah banyak diteliti. Daun *C. siamea* diketahui mengandung senyawa alkaloid (Depkes RI, 1989). Alkaloid secara farmakologi dikenal dapat mengobati malaria, seperti Alkaloid kinin yang digunakan selama bertahun-tahun untuk mengobati penyakit malaria (Mursito, 2002). Namun penggunaan obat tradisional dalam masyarakat hanya berdasarkan pengalaman atau empiri sehingga kurang bisa diterima secara luas. Oleh karena itu perlu adanya pengembangan dari obat tradisional ke fitofarmaka.

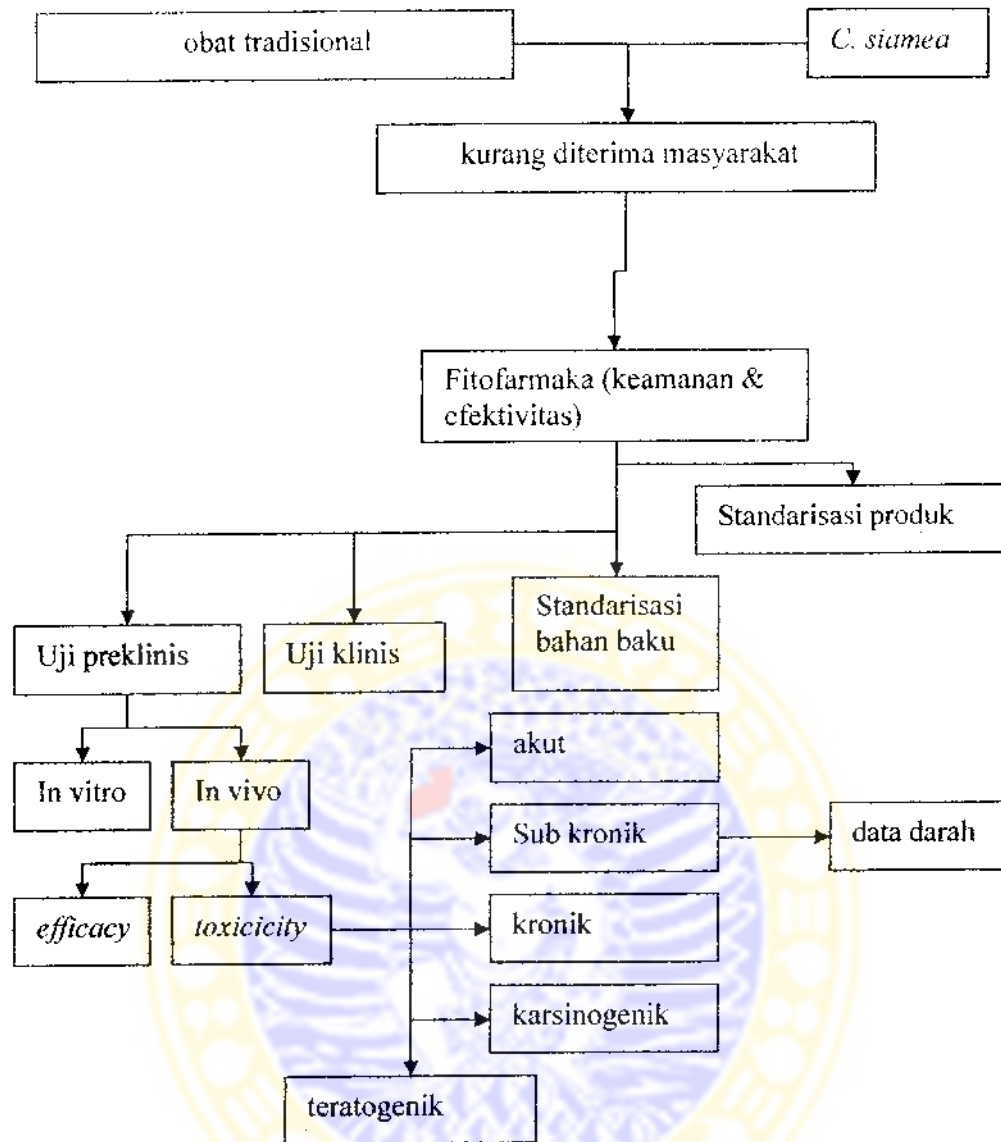
Sesuai Peraturan Kepala Badan Pengawasan Obat dan Makanan Nomor : HK.00.05.41.1384 tentang Kriteria dan Tatalaksana Pendaftaran Obat tradisional, Obat Herbal Terstandart dan Fitofarmaka. Pada pasal satu disebutkan bahwa Fitofarmaka adalah sediaan obat bahan alam yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinik dan uji klinik, bahan baku dan produk jadinya telah di standarisasi. Salah satu parameter keamanan suatu obat adalah uji toksisitas subakut yang termasuk dalam komponen studi praklinis

Aktivitas ekstrak daun *C. siamea* Fraksi etil asetat terhadap Plasmodium berghei secara *in vivo* didapatkan harga ED₃₀ sebesar 40,3796 mg/kg BB (Nugroho, 2006). Pada penelitian selanjutnya diketahui LD₅₀ sebesar 16,57 g/kg BB mencit. Meskipun harga LD₅₀ sudah ada namun manusia lebih sering terpajan zat kimia dengan dosis yang jauh lebih rendah daripada dosis yang menyebabkan

kematian. Tetapi pajanan itu biasanya jauh lebih lama. Untuk menilai efek toksik dalam situasi yang lebih realistis ini, dilakukan penelitian jangka pendek melalui uji toksistas subkronik dan jangka panjang melalui uji toksistas kronik (Lu, 1995).

Dengan meneliti berbagai data yang sudah terbukti keefektifan penggunaan Ekstrak *C. siamea* Fraksi Etil Asetat untuk menghambat penyakit malaria secara *in vitro* maupun *in vivo* pada hewan coba, maka sangat perlu dilakukan uji keamanan atau toksisitas dari Ekstrak *C. siamea* Fraksi Etil Asetat pada hewan uji melalui uji toksisitas sub kronik guna melengkapi data praklinis suatu sediaan fitofarmaka.





Gambar 3.1 Bagan kerangka konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan Penelitian

4.1.1. Bahan Tanaman

Daun johar (*Cassia siamea*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dan dideterminasi di Kebun Raya Purwodadi.

4.1.2. Bahan Kimia

Untuk ekstraksi alkaloid :

1. n-heksana
2. Etanol 90 %
3. Etil asetat
4. NH_4OH 25 %
5. Aquadest
6. Asam tartrat

Bahan untuk pengambilan sample dan pemeriksaan darah :

- 1 Na F
- 2 EDTA
- 3 Eter

4.1.3. Hewan coba

Dalam penelitian ini , hewan coba yang dipakai adalah tikus putih (*Ratus novergicus*) galur wistar jantan, usia 2,5 bulan dengan berat rata-rata 250 gram yang dipeoleh dari Pusat Veteriner Farmasi Surabaya.

4.2. Alat-Alat

4.2.1. Alat untuk ekstraksi

Dalam penelitian ini digunakan beberapa alat antara lain : timbangan, toples, penyaring buchner, pompa vakum, corong pisah, gelas ukur, gelas beker, Erlenmeyer, rotavapor, cawan porselen, dan batang pengaduk.

4.2.2. Alat untuk uji toksisitas

Alat-alat yang digunakan untuk uji toksisitas sub akut antara lain : alat sonde, labu ukur, beker glass, cawan porselin, batang pengaduk, sudip, mortir, stamper, lemari pendingin, neraca analitik, dan sonicator.

Alat- alat untuk pengambilan darah antara lain: stoples+tutup, kapas, sungkup , papan bedah, penjepit, spuit 10 ml. + jarum 23 G, venoject dan vial.

4.2.3. Alat untuk pemeriksaan hematologi

Alat-alat yang digunakan untuk menghitung jumlah komponen darah antara lain mikroskop, Automatic Analyzer Hitachi. Penghitungan dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Surabaya.

4.3. Tahapan Kerja

4.3.1. Pembuatan Fraksi Etilasetat

Daun yang masih segar kemudian dicuci sampai bersih, lalu dikeringkan dengan cara dimasukkan ke dalam oven pada suhu 60⁰ C, dengan penurunan suhu secara bertahap, sambil sesekali daun dibolak-balik. Setelah simplisia kering, kemudian digiling sehingga diperoleh serbuk yang halus. Serbuk halus tersebut kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut n-Heksana. Selanjutnya didiamkan selama 24 jam sambil sesekali diaduk-aduk. Setelah didiamkan rendaman tersebut disaring dengan corong buchner yang dihubungkan dengan pompa vakum untuk mendapatkan filtratnya. Proses maserasi dan penyaringan ini dilakukan sebanyak tiga kali. Setelah proses maserasi, selanjutnya serbuk diangin-anginkan sampai bebas n-heksana.

Serbuk yang telah diangin-anginkan tadi selanjutnya dimaserasi kembali. Proses maserasi dilanjutkan dengan menggunakan pelarut etanol 90 % yang mengandung 1 % asam tartrat. Sama seperti proses maserasi dengan n-heksana, pada maserasi ini juga didiamkan selama 24 jam sambil sesekali dilakukan pengadukan. Setelah 24 jam, rendaman tersebut disaring dengan corong Buchner untuk mendapatkan filtratnya. Proses maserasi dan penyaringan ini dilakukan sebanyak tiga kali. Setelah itu filtrat diuapkan dengan rotavapor sampai didapatkan volume $\frac{1}{3}$ dari volume total. Untuk dapat memperoleh alkaloid dalam

bentuk base, perlu dilakukan penarikan dengan pelarut etil asetat. Sebanyak 12 gram ekstrak tersebut dilarutkan dalam air hingga 300 mL pada pH=8. Untuk mendapatkan suasana basa tersebut perlu ditambahkan NH_4OH 5%. Jumlah etilasetat yang digunakan sebanyak 300 mL untuk setiap 300 mL larutan ekstrak tersebut. Campuran tersebut dikocok selama 15 menit dengan menggunakan corong pisah.

Setelah dikocok campuran didiamkan sampai terlihat adanya pemisahan. Pendiaman pertama selama 24 jam. Setelah terlihat pemisahannya, fase etil asetat yang ada pada bagian atas ditampung, sedangkan fase air, untuk yang kedua kalinya dibasakan lagi pada pH=8 kemudian dikocok lagi dengan 300 mL etil asetat selama 15 menit lalu didiamkan selama 2 jam sampai terlihat adanya pemisahan. Fase etil asetat ditampung dan untuk yang terakhir kalinya fase air dikocok lagi dengan etilasetat dengan cara yang sama seperti pengocokan yang kedua. Hal ini dilakukan karena alkaloid base akan tertarik secara maksimal pada pelarut etil asetat. Hasil tampungan fase etil asetat, kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotavapor. Ekstrak kental yang dihasilkan dari rotavapor tersebut lalu diuapkan sampai diperoleh ekstrak yang kering. Selanjutnya ekstrak kering tersebut ditetapkan kadarnya dengan metode KLT-densitometri.

4.3.4 Pemilihan Dosis uji Toksisitas Subkronis

Banyaknya dosis yang diberikan pada binatang percobaan didasarkan atas Dosis Lazim (DL) yang telah diketahui pada uji aktivitas Fraksi Etil Asetat Daun Johar pada mencit dengan mengkonversikannya pada tikus. ED_{80} (Berdasar ED_{50} penelitian Nugroho, 2006) diketahui : 40,38 mg/KgBB mencit faktor koreksi pada penetapan kadar ekstrak 1,2 sehingga ED_{80} : $1,2 \times 40,38 \text{ mg/KgBB} = 48,46 \text{ mg/Kg BB}$ mencit. Untuk 20 g mencit : $20/1000 \times 48,46 \text{ mg/KgBB} = 0,97 / 20 \text{ g}$ mencit. Faktor konversi ke tikus : 7. sehingga untuk 200 g tikus dibutuhkan ekstrak : $7 \times 0,97 \text{ mg} = 6,78 \text{ mg} / 200 \text{ g}$ tikus. Dosis tersebut dibuat dalam 2 mL. Dibuat sediaan sebanyak 100 mL. Sehingga :

$$1 \text{ DL} = 6,78 \text{ mg} \times 50 = 339 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$$

$$5 \text{ DL} = 6,78 \times 5 \times 50 = 1.695 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$$

$$10 \text{ DL} = 6,78 \times 10 \times 50 = 3.390 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$$

Control = 0,5 g CMCNa dalam 100 mL aquadest.

4.3.3 Pembuatan Kontrol negatif dan larutan uji

4.3.3.1. Pembuatan kontrol negatif:

1. Timbang sebanyak 0.5000 g CMC-Na, masukkan ke mortir.
2. Larutkan dalam aquadest 20 mL, gerus dengan stamper ad terbentuk mucilago, pindahkan ke dalam labu ukur 100.0 mL,
3. Tambahkan aquadest ad tepat tanda.

4.3.3.2 Pembuatan larutan uji :

Untuk 1 kali dosis lazim (1 DL) :

- a. 0.5000 g CMC-Na, larutkan dalam aquadest 20 mL pada mortir, gerus ad terbentuk mucilago
- b. 0.3398 mg ekstrak + (a), gerus ad homogen, pindahkan ke labu ukur 100.0 mL, tambahkan aquadest ad tepat tanda, masukkan sonicator selama 1 jam.

Prosedur yang sama digunakan untuk dosis 5 dan 10 kali dosis lazim. Untuk 5 kali dosis lazim penimbangan ekstrak sebanyak 1.6990 g, dan untuk 10 kali dosis lazim sebanyak 3.3980 g. Sedangkan untuk penimbangan CMC-Na masing-masing 0.5000 g.

4.3.4 Perlakuan terhadap hewan coba

Hewan coba ditimbang berat badannya sebelum perlakuan, dan setiap satu minggu sekali hewan coba ditimbang. Selama perlakuan, hewan coba tetap diberi makan dan minum seperti biasa, dan kandang hewan juga tetap dibersihkan dan dilakukan penggantian sekam setiap 4 hari sekali

Kontrol negatif maupun larutan uji diberikan secara per oral menggunakan alat sonde. Pemberian dilakukan sehari satu kali selama 30 hari. Disiapkan 4 kelompok tikus putih, yang masing – masing kelompok terdiri dari 12 ekor tikus jantan umur awal 3 bulan. Pengelompokan dipelihara $\frac{1}{2}$ bulan untuk penyesuaian dengan lingkungan.

Kelompok 1 : merupakan kelompok kontrol negatif, yang diberi suspensi CMCNa 0,5 %.

Kelompok 2 : diberi suspensi fraksi Etil Asetat dengan dosis 1 x Dosis Lazim pada mencit yang dikonversikan dengan berat tikus yaitu 6,784 mg/ 200 g tikus

Kelompok 3 : diberi suspensi fraksi Etil Asetat dengan dosis 5 x Dosis Lazim pada mencit yang dikonversikan dengan berat tikus yaitu 33,919 mg/ 200 g tikus

Kelompok 4 : diberi suspensi fraksi Etil Asetat dengan dosis 10 x Dosis Lazim pada mencit yang dikonversikan dengan berat tikus yaitu 67,838 mg/ 200 g tikus.

4.3.5 Pengambilan darah hewan coba

Hewan coba dianestesi dengan eter sampai pingsan, setelah itu diletakkan pada papan bedah. Darah diambil secara intrakardial dengan spuit injeksi 10 mL dan jarum 23 G sebanyak mungkin (min 5.0 mL darah). Darah tersebut dibagi menjadi tiga bagian:

- a. bagian 1 : sebanyak $\pm 2,5$ mL, dimasukkan ke dalam tabung Venoject, ditutup mulut tabung tersebut dengan karet film, untuk selanjutnya disentrifuge untuk pemeriksaan serum (BUN, Kreatinin, SGOT, SGPT, Total Protein).
- b. bagian 2 : sebanyak ± 200 uL, dimasukkan ke dalam vial yang telah diisi antikoagulan NaF, dikocok (untuk pemeriksaan gula darah).
- c. bagian 3 : sebanyak ± 2 mL, dimasukkan ke dalam vial yang telah diisi antikoagulan EDTA, dikocok. (untuk pemeriksaan darah lengkap yang meliputi hitung jumlah eritrosit, hemoglobin, leukosit).

4.3.6 Pemeriksaan Darah dan Analisis data

Pemeriksaan hematologi dan kimia darah dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Pada pemeriksaan ini digunakan zat standar sebagai pembanding. Dari data-data yang didapatkan, masing-masing data dianalisis dengan statistik ANAVA satu arah pada tingkat kepercayaan 95% (harga $\alpha=0.05$) dimana sebagai variabel bebas adalah dosis dan sebagai variabel tergantung adalah komponen-komponen darah. Hipotesis statistik ini adalah:

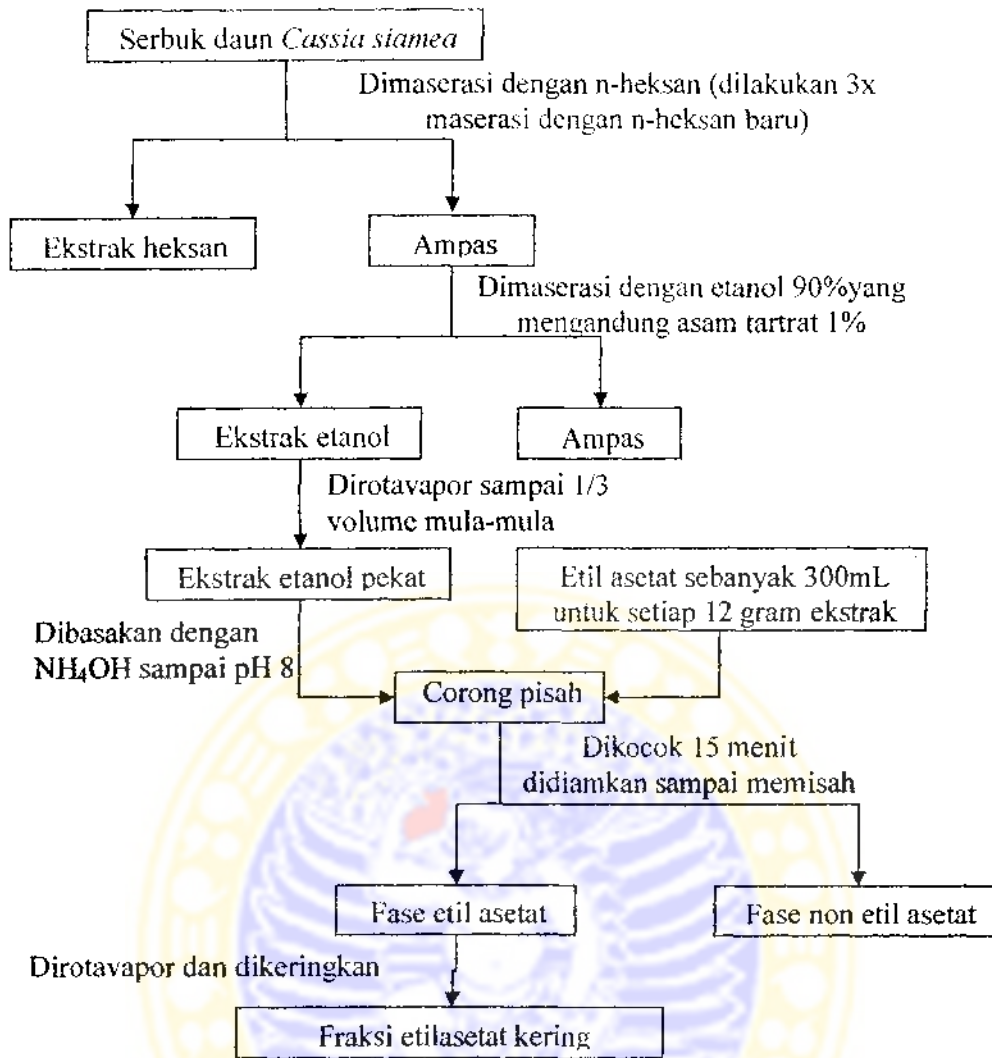
H_0 = tidak ada perbedaan dalam hal jumlah komponen-komponen darah

H_a = ada perbedaan dalam hal jumlah komponen-komponen darah

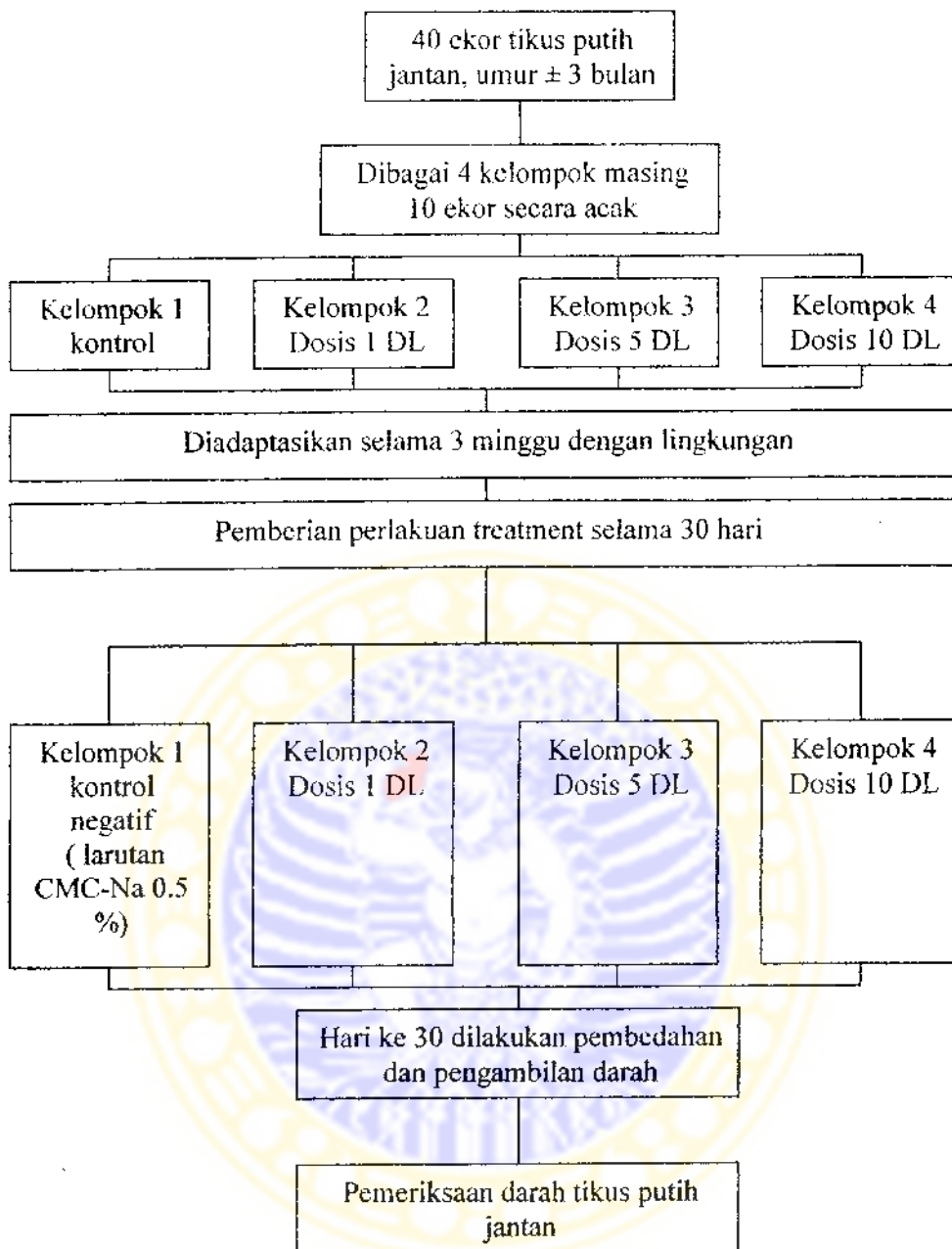
Dari analisis tersebut didapatkan harga F_{hitung} yang kemudian dibandingkan dengan F_{tabel} . Bila ternyata harga $F_{hitung} \geq F_{tabel}$ (harga sig $< \alpha$), maka H_0 ditolak

dan dapat diartikan ada perbedaan yang bermakna dalam hal jumlah komponen-komponen darah. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan tersebut, maka selanjutnya dilakukan *posthoc-test* melalui uji LSD pada data-data tersebut.

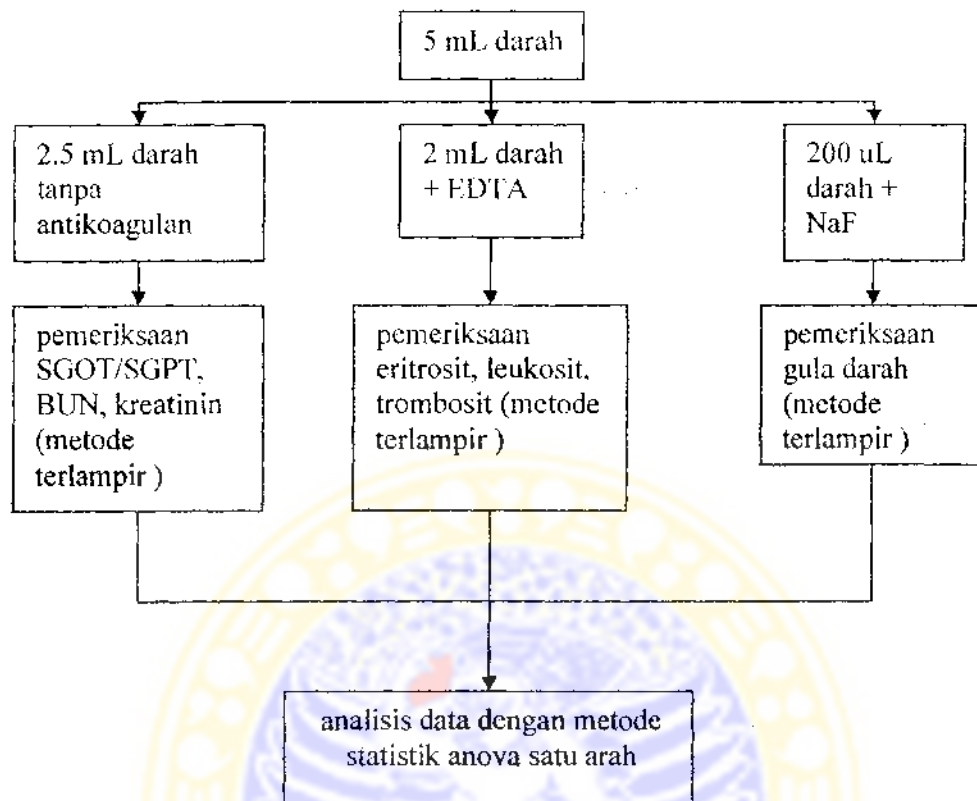




Gambar 4.1 Bagan pembuatan fraksi etil asetat daun *C. siamea*



Gambar 4.2 Bagan uji toksisitas subkronik



Gambar 4.3 Bagan preparasi sampel, pemeriksaan sampel dan analisis data

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Pembuatan Fraksi etil asetat

Hasil pembuatan fraksi etil asetat daun *Cassia siamea* Lamk ditunjukkan pada tabel V.1

Tabel V.1 Hasil pembuatan fraksi etil asetat daun *Cassia siamea* Lamk

No	Uraian	Jumlah
1.	Jumlah simplisia yang dimaserasi	9278 g
2.	Jumlah n-heksan yang digunakan	111.34 L
3	Jumlah etanol 90 % yang digunakan	111.34 L
4.	Jumlah fraksi etanol yang didapat	1520 g
5.	Jumlah etil asetat	114 L
6.	Jumlah fraksi etil asetat setelah dipekatkan	164 g

Ini berarti 1 g fraksi etil asetat ekuivalen dengan 56.57 g simplisia

5.2 Hasil Pengamatan organoleptik ekstrak

Fraksi etil asetat daun *Cassia siamea* Lamk yang diperoleh diamati secara organoleptik, hasil pengamatan ditunjukkan pada tabel V.2

Tabel V.2 Hasil pengamatan organoleptik fraksi etil asetat daun *Cassia siamea* Lamk

No	Uraian	Hasil
1	Bentuk	Cairan kental
2	Warna	Cokelat kehitaman
3	Bau	Khas aromatic
4	Rasa	Pahit

5.3 Pembuatan Sediaan

Fraksi Etil Asetat disuspensikan dengan musilago CMC-Na 0.5 % sebanyak 2 ml untuk 200 gram berat badan tikus. Kontrol negatif hanya diberi suspensi CMCNa 0.5 %.

a. Pembuatan Mucilago CMC-Na 0,5%

Ditimbang 0.5 g CMC-Na, ditaburkan dipermukaan aquadest yang telah dipanaskan dengan volume 20 berat CMC-Na pada mortir dan biarkan mengembang selama 15 menit, gerus sampai homogen dan terbentuk musilago.

b. Pembuatan Suspensi Fraksi Etil Asetat

Musilago yang telah terbentuk ditambang Fraksi Etil Asetat sesuai dengan dosis uji. Gerus sampai terbentuk suspensi kental yang homogen. Ditambah aquadest sedikit – sedikit hingga terbentuk suspensi yang bisa dituang. Dipindah ke dalam beker glaas 100 mL kemudian pindahkan ke labu ukur 100 mL. Sisa suspensi pada mortir dan beker glass dibersihkan dengan aquadest , tambahkan ke labu ukur sampai tanda. Suspensi di ultrasonic selama 1 jam.

5.4 Pemilihan Dosis uji Toksisitas Subkronis

Banyaknya dosis yang diberikan pada binatang percobaan didasarkan atas Dosis Lazim (DL) yang telah diketahui pada uji aktivitas Fraksi Etil Asetat Daun Johar pada mencit dengan mengkonversikannya pada tikus. ED_{80} (Berdasar ED_{50} penelitian Nugroho, 2006) diketahui : 40.38 mg/KgBB mencit faktor koreksi pada penetapan kadar ekstrak 1.2 sehingga ED_{80} : 1.2×40.38 mg/KgBB = 48.46 mg/Kg BB mencit. Untuk 20 g mencit : $20/1000 \times 48.46$ mg/KgBB = 0.97 / 20 g mencit. Faktor konversi ke tikus : 7. sehingga untuk 200 g tikus dibutuhkan ekstrak : 7×0.97 mg = 6.79 mg/ 200 g tikus. Dosis tersebut dibuat dalam 2 mL. Dibuat sediaan sebanyak 100 mL. Sehingga :

$$1 \text{ DL} = 6.79 \text{ mg} \times 50 = 339.50 \text{ mg/ 100 mL}$$

$$5 \text{ DL} = 6.79 \times 5 \times 50 = 1697.50 \text{ mg / 100 mL}$$

$$10 \text{ DL} = 6.79 \times 10 \times 50 = 3395.00 \text{ mg/ 100 mL}$$

Control = 0.5 g CMCNa dalam 100 mL aquadest.

5.4 Pemeriksaan serum tikus putih (*Ratus novergicus*) jantan

Fraksi etil asetat daun *Cassia siamea* Lamk yang diperoleh selanjutnya diberikan secara peroral pada *R. novergicus* jantan pada dosis tertentu selama tigapuluh hari. Selanjutnya, pada hari ke-31 dilakukan pengambilan darah dari *R. novergicus* jantan tersebut, selanjutnya darah tersebut dipreparasi lalu diukur kadar SGOT, SGPT, BUN, Kreatinin, Total Protein, gula darah dan komponen-komponen darah lainnya seperti eritrosit, leukosit, dan trombosit.

Dari data-data yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan metode statistik ANAVA sehingga akan didapatkan harga-harga sebagai berikut:

Tabel V.3 Harga rerata kadar SGOT hewan coba tiap kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar SGOT (IU/L)	Simpangan baku
Kontrol	11	212.4	31.9
Kelompok 1 DL	10	215.8	39.2
Kelompok 5 DL	9	274.6	110.9
Kelompok 10DL	10	218.1	114.4

Tabel V.4 Ringkasan ANAVA kadar SGOT hewan coba

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Kuadrat rerata	F hitung	Sig
Antar kelompok	24674.8	3	8215.9	1.231	0.313
Dalam kelompok	240209.3	36	6672.5		
Total	264857.1	39			

Data di atas menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kadar SGOT. Hal ini dapat dilihat dari harga F yang diperoleh lebih kecil daripada harga F tabel $(3;36) = 2.80$, disamping itu juga dapat dilihat dari harga signifikansi (Sig) pada tabel yang lebih besar daripada 0.05.

Tabel V.5 Harga rerata kadar SGPT hewan coba tiap kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar SGPT (IU/L)	Simpangan baku
Kontrol	11	60.7	18.2
Kelompok IDL	10	57.8	9.8
Kelompok 5DL	9	59.7	20.3
Kelompok 10DL	10	61.6	30.8

Tabel V.6 Ringkasan ANAVA kadar SGPT hewan coba

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Kuadrat Rerata	F hitung	Sig
Antar kelompok	80.8	3	26.9	0.060	0.980
Dalam kelompok	16030.2	36	445.3		
Total	16110.9	39			

Data di atas menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kadar SGPT. Hal ini dapat dilihat dari harga F yang diperoleh lebih kecil daripada harga F tabel (3;36) = 2.80, disamping itu juga dapat dilihat dari harga signifikansi (Sig) pada tabel yang lebih besar daripada 0.05.

Tabel V.7 Harga rerata kadar BUN hewan coba tiap kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar BUN (mg/dl)	Simpangan baku
Kontrol	11	21.18	4.7
Kelompok 1DL	10	22.00	2.5
Kelompok 5DL	9	23.89	1.6
Kelompok 10DL	10	26.30	2.8

Tabel V.8 Ringkasan ANAVA kadar BUN hewan coba

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Kuadrat rerata	F hitung	Sig
Antar kelompok	159.4	3	53.1	5.132	0.005
Dalam kelompok	372.6	36	10.4		
Total	531.9	39			

Data di atas menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kadar BUN. Hal ini dapat dilihat dari harga F yang diperoleh lebih besar daripada harga F tabel $(3;36) = 2.80$, disamping itu juga dapat dilihat dari harga signifikansi (Sig) pada tabel yang lebih kecil daripada 0.05.

Tabel V.9. Harga rerata kadar kreatinin hewan coba tiap kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar kreatinin (mg/dl)	Simpangan baku
Kontrol	11	0.56	0.026
Kelompok 1DL	10	0.55	0.025
Kelompok 5DL	9	0.69	0.025
Kelompok 10DL	10	0.68	0.034

Tabel V.10 Ringkasan ANAVA kadar kreatinin hewan coba

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Kuadrat rerata	F hitung	Sig
Antar kelompok	0.163	3	0.054	69.652	0.000
Dalam kelompok	0.028	36	0.001		
Total	0.191	39			

Data di atas menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kadar Kreatinin. Hal ini dapat dilihat dari harga F yang diperoleh lebih besar daripada harga F tabel $(3;36) = 2.80$, disamping itu juga dapat dilihat dari harga signifikansi (Sig) pada tabel yang lebih kecil daripada 0.05.

Tabel V.11 Harga rerata kadar protein total darah hewan coba tiap kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar protein Total (g/dl)	Simpangan baku
Kontrol	11	7.00	0.47
Kelompok 1DL	10	6.72	0.27
Kelompok 5DL	9	7.21	0.45
Kelompok 10DL	10	6.90	0.38

Tabel V.12 Ringkasan ANAVA kadar protein total hewan coba

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Kuadrat rerata	F hitung	Sig
Antar kelompok	1.197	3	0.399	2.485	0.076
Dalam kelompok	5.778	36	0.161		
Total	6.975	39			

Data di atas menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kadar Protein total serum. Hal ini dapat dilihat dari harga F yang diperoleh lebih besar daripada harga F tabel $(3;36) = 2.80$, disamping itu juga dapat dilihat dari harga signifikansi (Sig) pada tabel yang lebih besar daripada 0.05.

Tabel V.13 Harga rerata kadar glukosa darah hewan coba tiap kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar glukosa (mg/dl)	Simpangan baku
Kontrol	11	130.55	23.27
Kelompok 1DL	10	129.90	9.45
Kelompok 5DL	9	130.33	16.09
Kelompok 10DL	10	144.20	8.26

Tabel V.14 Ringkasan ANAVA kadar glukosa darah hewan coba

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Kuadrat rerata	F hitung	Sig
Antar kelompok	1886.27	3	628.758	2.543	0.71
Dalam kelompok	8901.23	36	247.256		
Total	10787.50	39			

Data di atas menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kadar Glukosa darah. Hal ini dapat dilihat dari harga F yang diperoleh lebih besar daripada harga F tabel $(3;36) = 2.80$, disamping itu juga dapat dilihat dari harga signifikansi (Sig) pada tabel yang lebih besar daripada 0.05.

Tabel V.15 Harga rerata kadar hemoglobin hewan coba tiap kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar hemoglobin (g/dl)	Simpangan baku
Kontrol	11	13.17	1.54
Kelompok 1DL	10	13.82	0.88
Kelompok 5DL	9	13.91	1.02
Kelompok 10DL	10	13.89	0.79

Tabel V.16 Ringkasan ANAVA kadar hemoglobin hewan coba

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Kuadrat rerata	F hitung	Sig
Antar kelompok	3.95	3	1.316	1.066	0.376
Dalam kelompok	44.46	36	1.235		
Total	48.40	39			

Data di atas menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal jumlah Hemoglobin. Hal ini dapat dilihat dari harga F yang diperoleh lebih besar daripada harga F tabel $(3;36) = 2.80$, disamping itu juga dapat dilihat dari harga signifikansi (Sig) pada tabel yang lebih besar daripada 0.05.

Tabel V.17 Harga rerata kadar eritrosit darah tiap kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar eritrosit ($\times 10^6/\text{dl}$)	Simpangan baku
Kontrol	11	6.05	1.60
Kelompok 1DL	10	6.75	1.11
Kelompok 5DL	9	6.34	1.28
Kelompok 10DL	10	6.96	1.22

Tabel V.18 Ringkasan ANAVA kadar eritrosit hewan coba

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Kuadrat rerata	F hitung	Sig
Antar kelompok	5.13	3	1.709	1.155	0.340
Dalam kelompok	53.24	36	1.479		
Total	58.37	39			

Data di atas menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal jumlah Eritrosit. Hal ini dapat dilihat dari harga F yang diperoleh lebih besar daripada harga F tabel $(3;36) = 2.80$, disamping itu juga dapat dilihat dari harga signifikansi (Sig) pada tabel yang lebih besar daripada 0.05.

Tabel V.19 . Harga rerata kadar lekosit hewan coba tiap kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar lekosit ($\times 10^3/\text{dl}$)	Simpangan baku
Kontrol	11	5.70	2.17
Kelompok 1	10	6.41	3.02
Kelompok 2	9	5.97	3.61
Kelompok 3	10	7.05	4.15

Tabel V.20 Ringkasan ANAVA kadar lekosit darah hewan coba

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Kuadrat rerata	F hitung	Sig
Antar kelompok	10.69	3	3.56	0.330	0.804
Dalam kelompok	338.83	36	0.40		
Total	399.52	39			

Data di atas menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal jumlah lekosit. Hal ini dapat dilihat dari harga F yang diperoleh lebih besar daripada harga F tabel $(3;36) = 2.80$, disamping itu juga dapat dilihat dari harga signifikansi (Sig) pada tabel yang lebih besar daripada 0.05.

BAB VI

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan daun *Cassia siamea* yang diambil dari Kebun Raya Purwodadi dalam bentuk daun segar. Selanjutnya daun tersebut dicuci bersih, dikeringkan dengan oven pada suhu 40⁰C kemudian diserbuk. Serbuk daun yang diperoleh diekstraksi dengan pelarut n-heksan dilanjutkan dengan pelarut etanol dan terakhir dengan etil asetat. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Mula-mula serbuk daun dimaserasi dengan n-heksan selama 24 jam sebanyak 3 kali, kemudian maserat diambil. Selanjutnya maserat yang diperoleh dimaserasi sebanyak 3 kali selama 24 jam dengan etanol 90 % yang telah diasamkan dengan penambahan asam tartrat. Fraksi etanol yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental. Fraksi etanol yang sudah pekat tersebut kemudian dilarutkan dengan air kemudian ditarik dengan etil asetat. Fase air ditarik dengan etil asetat sebanyak dua kali. Hasil ekstraksi yang diperoleh dipekatkan dengan rotavapor sehingga diperoleh ekstrak kental dengan kesetaraan 1 g fraksi etil asetat ekivalen dengan 10,5882 g simplisia. Hasil ekstraksi dengan etil asetat ini kemudian diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak ini selanjutnya dinamakan Fraksi etil asetat daun *C. siamea* Lamk. Fraksi etil asetat daun *C. siamea* Lamk yang dihasilkan berupa zat kental, berwarna coklat kehitaman, dengan bau khas aromatik, dan rasanya pahit. Bentuk inilah yang digunakan sebagai bahan uji penelitian setelah terlebih dulu ditetapkan kadarnya.

Terkait dengan toksisitas dari daun *C. siamea*, juga telah dilakukan berbagai penelitian. Ekasari (2006) juga telah melakukan uji toksistas akut fraksi etil asetat daun *C. siamea* didapat LD₅₀ (*Letal Dose*) sebesar 16,57 g/kg BB mencit. Uji toksistas subkronik yang telah dilakukan baru sebatas pada ekstrak etanol yaitu pada rodent (tikus) maupun non-rodent (kucing) terhadap ekstrak etanol 70 persen daun johar dengan hasil tidak menimbulkan keracunan atau hal-hal negatif lain dari beberapa organ penting tubuh seperti jantung, hati, paru, ginjal, lambung, maupun biokimia hewan uji seperti Hb, SGOT, SGPT, ureum,

dan kreatinin. Selain itu, ekstrak etanol 70 persen daun *C. Siamea* bersifat hepatoprotektif (Wahjoedi, 2003).

Pada uji toksisitas subkronik yang telah dilakukan belum ada yang melakukan pengujian terhadap fraksi etil asetat. Uji toksisitas yang telah dilakukan pada fraksi etilasetat baru sebatas uji toksisitas akut. Data toksisitas akut saja masih belum bisa menjamin keamanan suatu zat untuk bisa dikonsumsi secara luas sebab uji toksisitas akut hanya dilakukan pada waktu yang relatif singkat (7 hari) dan pemberian bahan uji hanya sekali. Meskipun data uji toksisitas akut menunjukkan hasil yang relatif tidak toksik, tetapi dalam pemberian berulang dan jangka panjang belum tentu tidak akan menimbulkan efek toksik. Hal ini disebabkan adanya efek kumulatif, perubahan enzim dan mekanisme lain (PPOM, 1991). Selain dari itu, pada penelitian uji toksisitas subkronik yang telah dilakukan baru sebatas pada ekstrak padahal bahan yang digunakan adalah fraksi, dimana ada perbedaan jumlah kumulatif zat aktif pada ekstrak dan fraksi pada berat yang sama sehingga bisa menyebabkan toksisitas. Untuk itu maka perlu dilakukan penelitian mengenai toksisitas subkronik fraksi etil asetat.

Uji toksisitas subkronik dilakukan untuk mendeteksi adanya respon toksik setelah pemberian toksikan secara berulang dalam dosis tertentu selama lebih kurang 10% masa hidup hewan coba. Uji toksisitas subkronik kali ini dilakukan pada tikus putih (*Ratus norvegicus*) jantan selama 30 hari. Uji toksisitas subkronik ini dilakukan dengan memberikan toksikan (bahan uji) secara peroral satu kali tiap hari. Dalam penelitian ini dipakai tiga tingkatan dosis yaitu 1; 5 dan 10 kali dosis lazim. Pada hari ke-31 dilakukan pengambilan darah hewan coba dan dilakukan pengamatan terhadap kadar kimia darah. Penelitian tentang darah telah banyak dilaksanakan secara intensif karena darah mudah diperoleh, memiliki makna fungsional yang penting dan terlibat dalam berbagai proses penyakit.

Dari hasil penelitian, selanjutnya dilakukan pengolahan data dengan metode statistik ANAVA. Hasil uji ANAVA terhadap kadar kreatinin menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok. Hal ini dapat dilihat dari harga F yang diperoleh lebih besar daripada harga F tabel $(3;36) = 2.80$, disamping itu juga dapat dilihat dari harga signifikansi (Sig) pada tabel yang lebih kecil daripada 0.05. Selanjutnya, uji LSD menunjukkan adanya perbedaan antara

kelompok kontrol dengan kelompok 5 Kali Dosis Lazim (5DL) dan 10 Kali Dosis Lazim (10DL). Rata-rata kadar kreatinin kelompok kontrol = 0.5645 mg/dl, kelompok 5 DL = 0.6911 mg/dl, kelompok 10 DL = 0.6830 mg/dl ; sedangkan harga normal untuk tikus adalah 0.4 – 1.5 mg/dl. Jadi, perbedaan kadar kreatinin antara kelompok kontrol dengan kelompok 5 DL dan kelompok 10 DL juga masih dalam batas harga normal kreatinin tikus. Kreatinin merupakan produk sisa yang utama dari metabolisme kreatin oleh otot. Kreatinin bebas berada dalam darah dan bisa berdifusi secara bebas antara sel dan air plasma. Kreatinin difiltrasi oleh glomerulus dan di ekskresi secara aktif oleh tubulus. Meningkatnya kadar kreatinin dalam darah merupakan indikator rusaknya ginjal. Pada kegagalan ginjal, kreatinin ditahan bersama unsur non nitrogen protein darah.

Pada uji ANAVA terhadap kadar BUN juga menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok. Hal ini dapat dilihat dari harga F yang diperoleh lebih besar daripada harga F tabel (3;36) = 2.80 ; disamping itu juga dapat dilihat dari harga signifikansi (Sig) pada tabel yang lebih kecil daripada 0,05. Selanjutnya, uji LSD menunjukkan adanya perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok 10 Kali Dosis Lazim (10DL). Rata-rata kadar BUN kelompok kontrol = 21.18 mg/dl, kelompok 10 DL = 26.30 mg/dl ; sedangkan harga normal untuk tikus adalah 15-29 mg/dl. Jadi, perbedaan kadar BUN antara kelompok kontrol dengan kelompok 10 DL juga masih dalam batas harga normal BUN tikus. Urea nitrogen diekskresi lewat ginjal. Pada keadaan kegagalan filtrasi glomerulus, zat ini ditahan sehingga kadar uera nitrogen dalam darah meningkat.

Sedangkan uji ANAVA untuk analisis kadar SGOT, SGPT, glukosa darah dan protein total serum tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna antarkelompok. Hal ini dapat dilihat dari harga F yang diperoleh lebih kecil daripada harga F tabel (3;36) = 2,80. Hal ini juga dapat dilihat dari harga signifikansi (Sig) pada tabel yang lebih besar daripada 0,05. Jadi pemberian bahan uji dengan dosis 1 kali dosis lazim, 5 kali dosis lazim dan 10 kali dosis lazim selama 30 hari tidak mempengaruhi kadar SGOT, SGPT, glukosa darah dan protein total serum hewan coba. Hal ini menandakan tidak adanya kerusakan hepar, ginjal dan pankreas karena perubahan parameter kimia darah tersebut terkait dengan fungsi organ-organ tersebut. Harga rerata kadar BUN, kreatinin,

SGOT, SGPT, glukosa darah dan protein total dari masing-masing kelompok serta ringkasan uji ANAVAnyanya dapat dilihat pada table V.3 s.d V.14

Pada pemeriksaan hematologi untuk eritrosit, lekosit, dan hemoglobin; uji ANAVA memberikan harga F lebih kecil daripada F tabel dan harga signifikansi (Sig) lebih besar dari 0.05. Hal ini menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna antarkelompok dalam hal jumlah sel-sel darah tersebut. Jadi, pemberian bahan uji dengan dosis 1, 5, dan 10 kali dosis lazim, selama 30 hari pada hewan coba tidak berpengaruh pada jumlah eritrosit, lekosit dan hemoglobin. Hal ini menandakan tidak adanya kerusakan pada hepar maupun sumsum tulang belakang terkait pembentukan dan limpa terkait perombakan sel-sel darah tersebut. Harga rerata jumlah eritrosit, lekosit, hemoglobin dari masing-masing kelompok serta ringkasan uji ANAVAnyanya dapat dilihat pada tabel V.15 s.d V.20.

Data toksisitas pada darah ini bersifat sebagai data pendukung pada pemeriksaan histopatologi. Oleh karena itu, sebagai lanjutan dari uji toksisitas secara keseluruhan, maka perlu dilakukan pemeriksaan histopatologi seperti hepar, renal, pankreas dan limpa *R. Novergicus* jantan tersebut. Hal ini dikarenakan data kimia darah dan sel-sel darah tersebut diatas terkait dengan fungsi organ-organ tersebut.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

8.1 Kesimpulan

Pemberian fraksi etilasetat daun johar (*Cassia siamea*) secara peroral pada tikus putih (*Ratus novergius*) jantan dengan dosis 1, 5, dan 10 kali dosis lazim, sekali setiap hari selama 30 hari tidak menimbulkan perubahan pada parameter kimia darah dan jumlah sel-sel darah *R. novergius* jantan.

8.2 Saran

Perlu dilakukan pemeriksaan histopatologi *R. novergius* jantan tersebut guna mendukung dan melengkapi data toksisitas subkronik fraksi etilasetat daun *C. siamea*.



DAFTAR PUSTAKA

- Backer, C.A dan Backhuizen Van Den Brink, B.C.1965. **Flora of Java** vol.II. Groningen The Netherland: NVP Nordhoff
- Baker, H.J; Lindsey, J.R; dan Weisbroth , S.H. 1979. **The Laboratory Rat : Biology and Diseases** vol.I. Academic Press Inc: London
- Baron ,D.N. 1990. **Kapita Selekt Patologo Klinik** edisi 4, alih bahasa oleh Petrus Andrianto dan Johanes Gunawan. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta
- Depkes Republik Indonesia. 1989. **Cassia siamea** Folium, **Materia Medika Indonesia** jilid V. Jakarta
- Derelanko , M.J and Hollinger, M.A. , 1995. **CRC Handbook of Toxicology**. CRC Press.New York. hal 657
- Ekasari, Wiwied. 2001. Daya hambat senyawa alkaloid daun *Cassia siamea* pada biakan in vitro *Plasmodium falciparum*.Tesis. Universitas Airlangga: Surabaya
- El-Sayyed, S.M; Ross S.A,dan Sayyed H.M. 1994. New isoquinolone alkaloids from the leaves of *Cassia siamea*. **Journal of Natural Product**. Vol: 47
- Febriyanti, A.P. 2006. Uji Toksisitas Subakut Fasa Air Daun *Justisia gendarussa* Burn. f terhadap Kimia Darah Kelinci (SGOT, SGPT, Fosfatase alkali, BUN, dan Kreatinin) . **Skripsi**. Universitas Airlangga: Surabaya.
- Guyton , A.C. 1976. **Buku Teks Fisiologi Kedokteran**, diterjemahkan oleh Adji Dharma. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta
- Murray , R.K; dkk. 2003. **Biokimia Harper** edisi 25, alih bahasa oleh Andry Hartono. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta
- Heyne, K. **Tumbuhan Berguna Indonesia** jilid 3, diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan. Jakarta
- Kusumawati, Diah. 2004. **Bersahabat Dengan Hewan Coba**. Gadjah Mada University Press : Yogyakarta.
- Loomis ,T.A. 1978. **Toksikologi Dasar** edisi III, alih bahas oleh Donatus I.A, dkk. IKIP Semarang Press : Semarang

- Lu, F.C. 1995. **Toksikologi Dasar: Asas Organ Sasaran dan Penilaian Resiko** edisi II. Penerbit Universitas Indonesia : Jakarta
- Nugroho, Sriajiono. 2006. **Aktivitas Antimalaria Fraksi Etilasetat Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk) pada *Plasmodium berghei* secara in vivo. Skripsi.** Universitas Airlangga : Surabaya.
- Paget, G.E., and Barners, J. M., 1964. "Toxicity Test", in : Laurance, D.R. and Bacharach, A. L., (Eds). **Evaluation of Drug Activity Pharmacometrics.** London : Academic Press LTD, p. 135-39
- Price , S.A dan Wilson, L.M. 1995. **Fisiologi Proses-Proses Penyakit** edisi IV. Penerbit Buku Kedokteran EGC : Jakarta.
- Purwanto E, 1997. Pengaruh fraksi heksan, kloroform dan methanol daun *Cassia siamea* Lamk. terhadap pertumbuhan *Plasmodium falciparum* in vitro. **Skripsi.** Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya
- Schefler , William C., 1987. **Statistika untuk biologi, farmasi, kedokteran, dan ilmu yang bertautan.** penerbit ITB Bandung, Bandung, 230-3
- Smith, J.B., 1998, **Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis.** Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta, 37-39
- Wijisekera, R. O. B., 1991. **The Medicinal Plant Industri,** London : CRC Press LLC, p. 1-6, 237-38
- http://www.adelaide.edu.au/ANZCCART/publications/FS_TheRat.pdf
- http://www.pom.go.id/public/hukum_perundangan/pdf/KRITCARA%PENDAFT.OT.pdf

LAMPIRAN I**Tabel konversi dosis antar spesies berdasarkan luas permukaan tubuh**

	Mencit 20g	Tikus 200g	Marmot 400g	Kelinci 1,5kg	Anjing 12kg	Manusia 70kg
Mencit 20g	1,0	7,0	12,25	27,8	124,2	387,9
Tikus 200g	0,14	1,0	1,74	3,9	17,8	56,0
Marmot 400g	0,08	0,57	1,0	2,25	10,2	31,5
Kelinci 1,5kg	0,04	0,25	0,44	1,0	4,5	14,2
Anjing 12kg	0,008	0,06	0,10	0,22	1,0	3,1
Manusia 70kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,32	1,0

(Laurance & Bacharach, 1964)

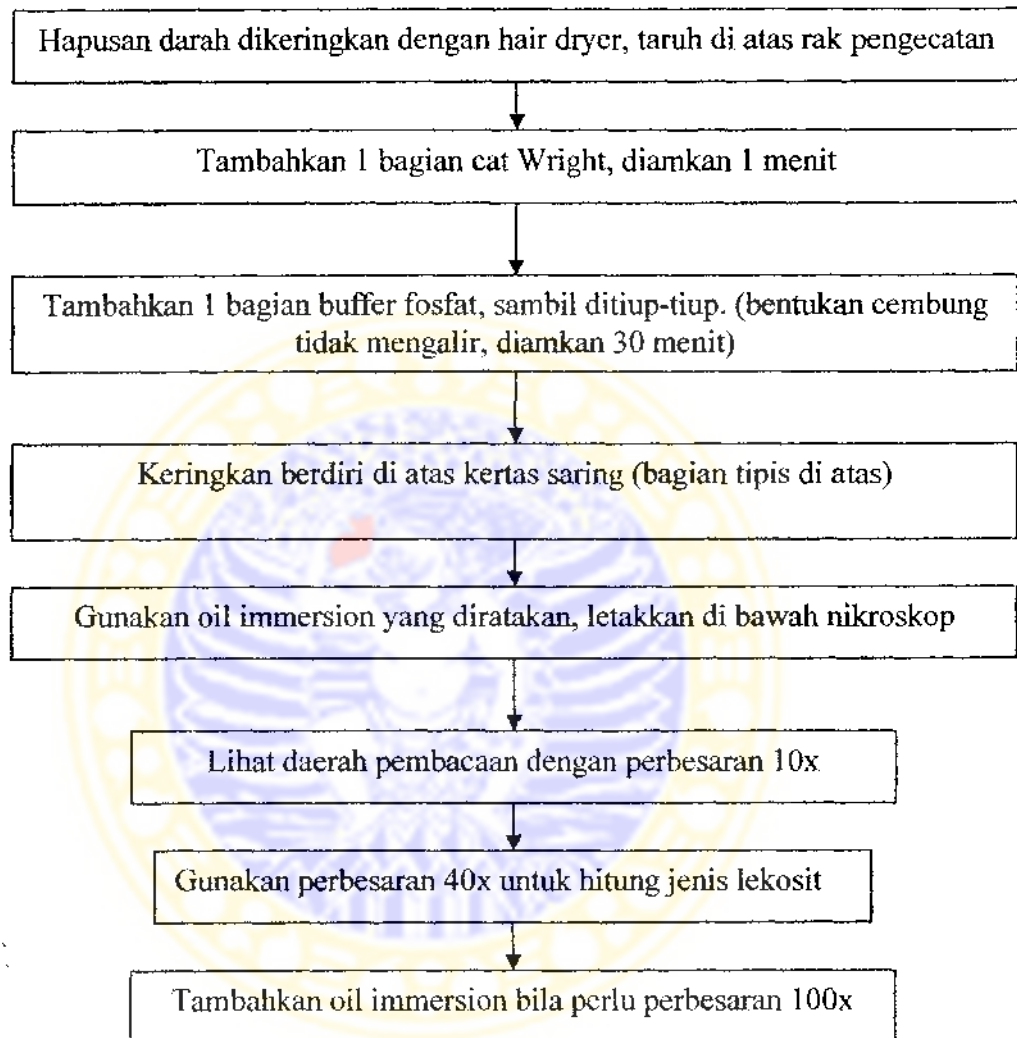


LAMPIRAN 2

Klasifikasi toksisitas

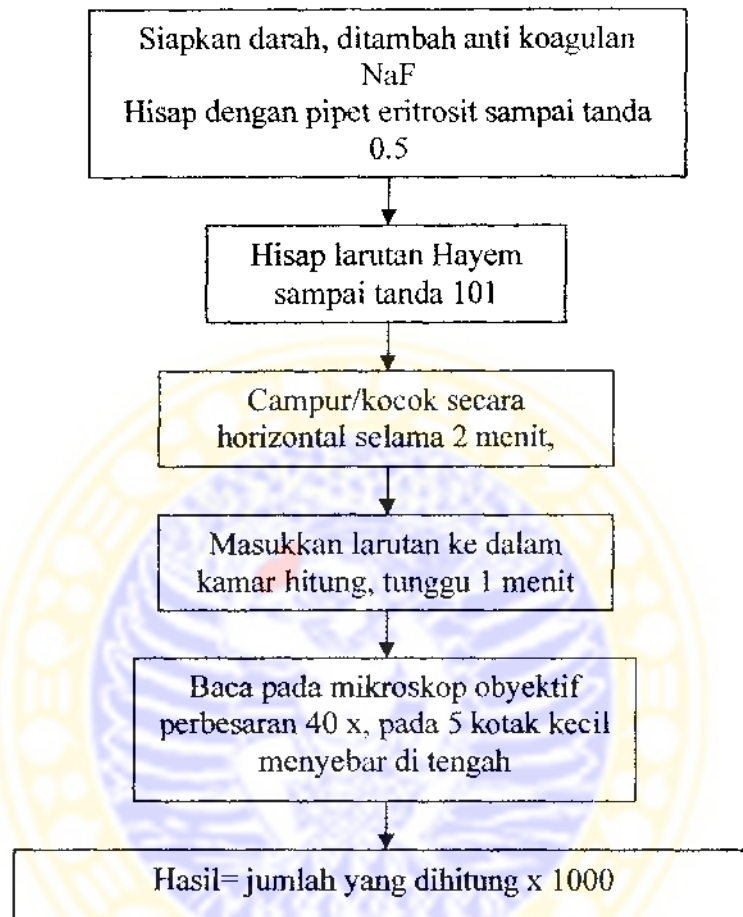
Toxicity Rating	Commonly Used Term	LD ₅₀ Single Oral Dose Rats	Inhalation 4-hr vapor Exposure Mortality of 2/6-4/6 Rats	LD ₅₀ Skin Rabbit	Probable Lethal Dose for Man
1	Extremely Toxic	≤ 1 mg/ kg	< 10 ppm	≤ 5 mg/ kg	A taste, 1 grain
2	Highly Toxic	1-50 mg	10-100 ppm	5-43 mg/ kg	1 teaspoon, 4cc
3	Moderately Toxic	50-500mg	100-1000 ppm	44-340 mg/kg	1 ounce, 30 gm
4	Slightly Toxic	0.5-5 g	1000-10000 ppm	0.35-2.81 g/kg	1 cup, 250
5	Practically Non-Toxic	5-15 g	10000-100000 ppm	2.82-22.59 g/kg	1 quart, 1000 gm
6	Relatively Harmless	> 15 g	> 100000 ppm	> 22.6 g/kg	> 1 quart

Dikutip dari : Derelanko , M.J and Hollinger, M.A. , 1995. *CRC Handbook of Toxicology*. CRC Press.New York. hal 657

LAMPIRAN 3**Skema metode hitung jenis leukosit**

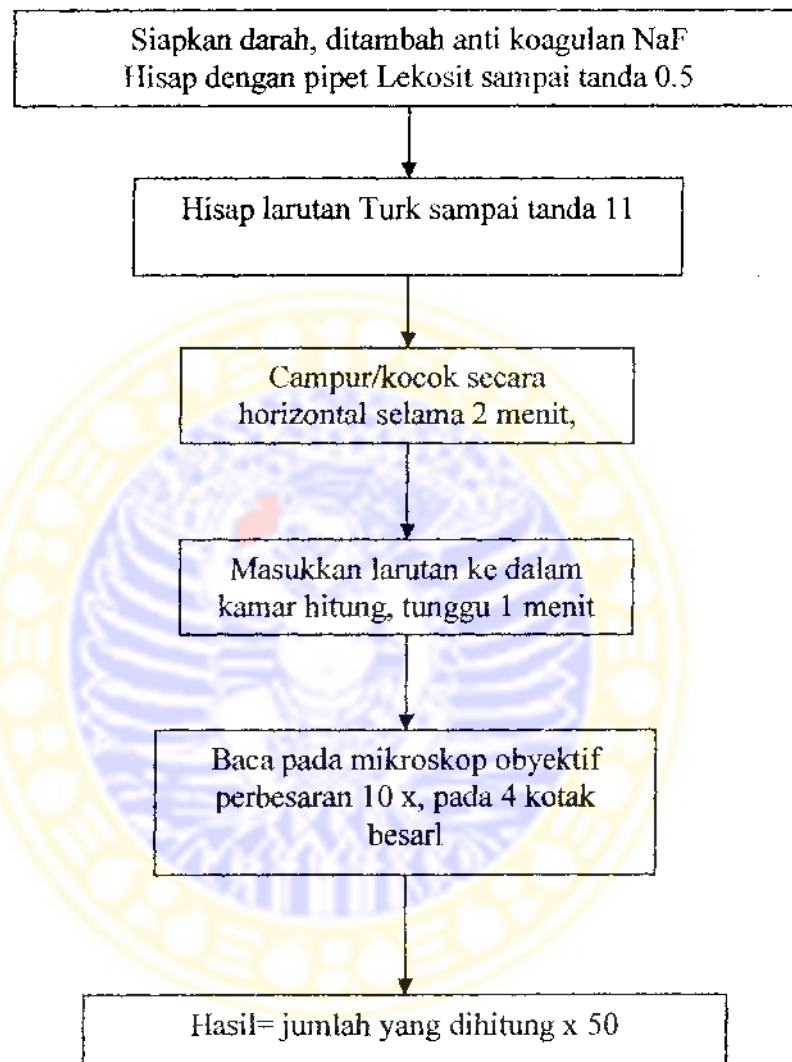
LAMPIRAN 4

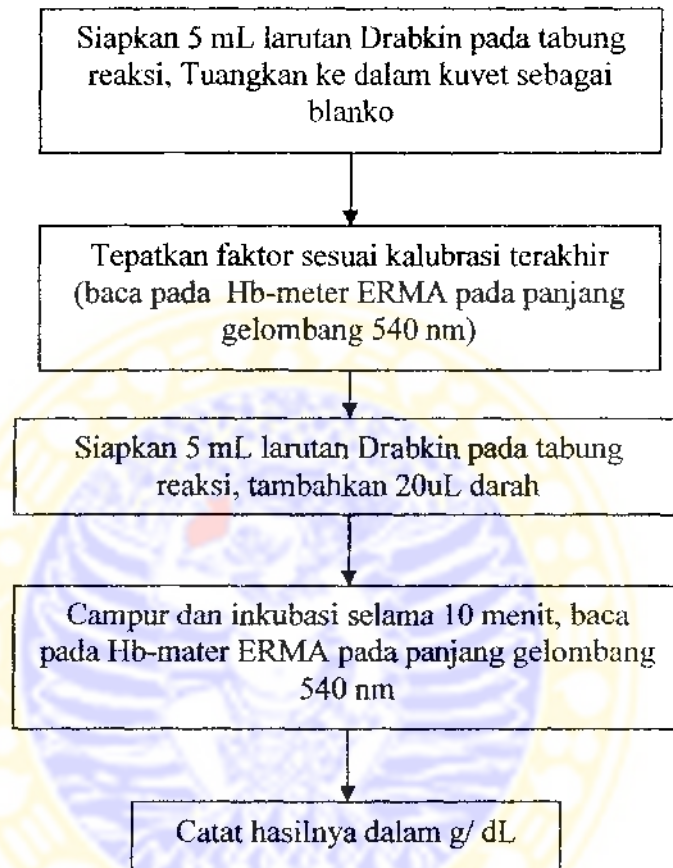
Skema metode hitung jumlah eritrosit



LAMPIRAN 5

Skema metode hitung jenis leukosit



LAMPIRAN 6**Skema metode pemeriksaan hemoglobin**

LAMPIRAN 7

Penetapan kadar kreatinin

Prosedur

1. Persiapan larutan kerja :

Campurkan 1 bagian larutan asam pikrat 8.8 mmol/ liter dengan 1 bagian larutan NaOH 0.4 mmol/ liter (biarkan mencapai suhu ruangan sebelum digunakan).

2. Persiapan larutan standard :

siapkan larutan standard kreatinin 1.5 mg/ dL

3. Persiapan alat :

penetapan kadar dilakukan dengan alat Automatic Analyzer Hitachi 902, dengan panjang gelombang 492 nm, suhu alat 25 ; 30 atau 37^o C , tebal kuvet 1 cm, dan sebagai blanko adalah larutan kerja.

4. Persiapan larutan yang akan dianalisis :

	blanko	standard	sampel
Larutan kerja	1100 uL	1000 uL	1000 uL
tempatkan pada suhu 25; 30 atau 37 ^o C (suhu pengamatan harus konstan)			
standard	-	100 uL	-
sampel	-	-	100 uL
Campur, baca absorban masing-masing antara t = 20 detik dan 80 detik terhadap blanko			

perhitungan :

$$C. \text{ sampel} / \text{Abs. sampel} = C. \text{ Standard} / \text{Abs. standard}$$

LAMPIRAN 8**Penetapan kadar BUN dengan metode Berthelot yang dimodifikasi**

Prosedur kerja :

1. Pembuatan larutan kerja :

Campurkan 1 bagian Urease ≥ 5000 U/ L ke dalam 1 bagian larutan dapar fosfat pH=8, kocok perlahan.

2. Pembuatan larutan standard :

Buatlah larutan standar Urea 50 mg/ L.

3. Persiapan alat :

penetapan kadar dilakukan dengan alat Automatic Analyzer Hitachi 902, dengan panjang gelombang 580 nm, suhu alat 20 ; 25 atau 37° C , tebal kuvet 1 cm, dan sebagai blanko adalah campuran antara larutan kerja dengan larutan sodium karbonat 83 mmol/ L dengan perbandingan 5 : 1

4. Persiapan larutan yang akan dianalisis :

	Blanko	Standard	Sampel
Sampel	-	-	20 uL
Standard	-	20 uL	-
Larutan Kerja	1000 uL	1000 uL	1000 uL
Campur, masing- masing diinkubasi selama 3 menit pada 37° C atau 10 menit pada 20-25° C			
larutan sodium karbonat 83 mmol/ L	200 uL	200 uL	200 uL
Campur, baca absorban masing-masing setelah 5 menit pada 37° C atau 10 menit pada 20-25° C terhadap blanko. Hindarkan cahaya langsung.			

perhitungan :

$$C. \text{ sampel} / \text{Abs. sampel} = C. \text{ Standard} / \text{Abs. standard}$$

LAMPIRAN 9**Penetapan kadar protein serum total**

Prosedur kerja :

1. Pembuatan larutan kerja :

Buatlah larutan NaOH 200mmol/ L

2. Pembuatan larutan standard :

Buatlah larutan standard protein 8g/dL

3. Persiapan alat :

penetapan kadar dilakukan dengan alat Automatic Analyzer Hitachi 902, dengan panjang gelombang 520-580 nm, suhu alat 20 atau 25° C , tebal kuvet 1 cm, dan sebagai blanko adalah larutan kerja

4. Persiapan larutan yang akan dianalisis :

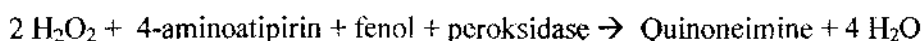
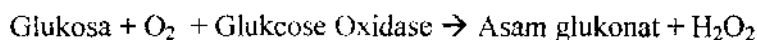
	blanko	standard / sampel
standard/ sampel	-	20 uL
larutan kerja	1000 uL	1000 uL
Campur dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 20 atau 25° C , baca absorban masing-masing		

perhitungan :

C. sampel / Abs. sampel = 8 x C. Standard/ Abs.standard.....g/dL

LAMPIRAN 10**Penetapan kadar gula darah**

prinsip reaksi



Prosedur kerja :

1. Pembuatan larutan kerja :

siapkan dapar fosfat pH 7.5 dengan kadar 250 mmol/L, larutan fenol 5 mmol/L, 4-aminoantipirin 0.5 mmol/L, glucose oxidase ≥ 10 kU/ L, peroksidase ≥ 1 kU/L.

2. Pembuatan larutan standard :

buatlah larutan standard glukosa 100 mg/ dL.

3. Persiapan alat :

penetapan kadar dilakukan dengan alat Automatic Analyzer Hitachi 902, dengan panjang gelombang 500 nm, suhu alat 20 ; 25 atau 37° C , tebal kuvet 1 cm, dan sebagai blanko adalah campuran larutan kerja.

4. Persiapan larutan yang akan dianalisis

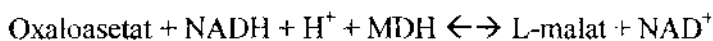
	blanko	sampel/ standard
sampel/ standard	-	10 uL
aquadest	10 uL	-
larutan kerja	1000 uL	1000 uL
Campur dan inkubasi masing-masing selama 20 menit pada suhu 20; 25° C atau 10 menit pada 37° C. Baca absorban masing-masing.		

perhitungan :

$$C. \text{ sampel} / \text{Abs. sampel} = C. \text{ Standard} / \text{Abs. standard}$$

LAMPIRAN 11**Penetapan kadar SGOT**

Prinsip reaksi :



Prosedur kerja :

1. Pembuatan larutan kerja I (R 1) :

siapkan larutan dapar TRIS pH 7.65 dengan kadar 80mmol/ L, larutan L-aspartat 240 mmol/L, MDH \geq 600 U/L, LDH \geq 900 U/L.

Pembuatan Larutan kerja II (R2) :

siapkan larutan 2-oxoglutarat 12 mmol/L, NADH 0.18 mmol/L

2. Persiapan alat :

penetapan kadar dilakukan dengan alat Automatic Analyzer Hitachi 902, dengan panjang gelombang 340 nm, suhu alat 37° C , tebal kuvet 1 cm, dan sebagai blanko adalah campuran R1 dan R2 dengan perbandingan 4:1.

3. Persiapan larutan yang akan dianalisis

	blanko	sampel
sampel	-	100 uL
R1	1000 uL	1000 uL
Campur, inkubasi selama 5 menit		
R2	250 uL	250 uL
Campur, Baca absorban masing-masing.setelah 1 menit, jalankan stopwatch dan baca lagi absorbansinya setelah 1; 2; dan 3 menit.		

perhitungan : (Δ absorban/ menit) x faktor = aktivitas SGOT [U/L]

LAMPIRAN 12**Penetapan kadar SGPT**

Prinsip reaksi :



Prosedur kerja :

1. Pembuatan larutan kerja I (R 1) :

siapkan larutan dapar TRIS pH 7.15 dengan kadar 100mmol/ L, larutan L-alanin 500 mmol/L, LDH \geq 1700 U/L.

Pembuatan Larutan kerja II (R2) :

siapkan larutan 2-oxoglutarat 15 mmol/L, NADH 0.18 mmol/L

2. Persiapan alat :

penetapan kadar dilakukan dengan alat Automatic Analyzer Hitachi 902, dengan panjang gelombang 340 nm, suhu alat 37° C , tebal kuvet 1 cm, dan sebagai blanko adalah campuran R1 dan R2 dengan perbandingan 4:1.

3. Persiapan larutan yang akan dianalisis

	blanko	sampel
sampel	-	100 uL
R1	1000 uL	1000 uL
Campur, inkubasi selama 5 menit		
R2	250 uL	250 uL
Campur, Baca absorban masing-masing.setelah 1 menit, jalankan stopwatch dan baca lagi absorbansinya setelah 1; 2; dan 3 menit.		

perhitungan : (Δ absorban/ menit) x faktor = aktivitas SGOT [U/L]

Lampiran 13**Data hasil pemeriksaan kimia darah hewan coba**

Kadar Kimia Darah pada Kelompok kontrol negatif

No	BUN mg/dL	Creatinin mg/dL	SGOT U/L	SGPT U/L	Tot.Protein g/dL	Glukosa mg/dL
1	25	0.62	213	56	7.88	156
2	27	0.55	231	84	6.68	132
3	17	0.57	185	52	7.06	136
4	24	0.57	239	94	7.26	113
5	23	0.56	268	56	6.87	149
6	27	0.58	244	63	7.44	89
7	13	0.57	186	32	6.18	119
8	16	0.51	194	78	6.74	152
9	22	0.56	197	60	6.55	117
10	22	0.57	158	44	7.13	164
11	17	0.55	221	49	7.26	109

Kadar Kimia Darah pada Kelompok 1 Dosis Lazim

No	BUN mg/dL	Creatinin mg/dL	SGOT U/L	SGPT U/L	Tot.Protein g/dL	Glukosa mg/dL
1	25	0.55	258	60	7.02	123
2	20	0.56	184	47	6.56	124
3	22	0.53	156	49	6.36	121
4	25	0.58	264	78	6.99	129
5	24	0.53	188	46	6.66	135
6	20	0.54	243	58	7.12	140
7	23	0.56	213	52	6.41	125
8	17	0.55	210	63	6.59	105
9	23	0.61	263	64	6.91	125
10	21	0.53	179	61	6.61	132

Kadar Kimia Darah pada Kelompok 5 Dosis Lazim

No	BUN mg/dL	Creatinin mg/dL	SGOT U/L	SGPT U/L	Tot.Protein g/dL	Glukosa mg/dL
01	25	0.70	508	94	6.48	146
02	21	0.71	190	39	6.60	130
03	22	0.69	407	92	7.16	151
04	25	0.73	276	50	7.24	146
05	23	0.67	244	61	7.42	123
06	26	0.69	239	60	7.63	117
07	25	0.69	227	44	7.67	140
08	24	0.64	174	43	6.59	110
09	24	0.70	206	54	7.76	110

Kadar Kimia Darah pada Kelompok 10 Dosis Lazim

No	BUN mg/dL	Creatinin mg/dL	SGOT U/L	SGPT U/L	Tot. Protein g/dL	Glukosa mg/dL
1	30	0.74	160	49	6.40	145
2	26	0.72	288	68	6.98	129
3	25	0.66	125	43	7.27	138
4	24	0.70	180	50	7.01	153
5	25	0.68	171	41	6.57	146
6	22	0.64	194	43	6.54	147
7	30	0.71	521	143	7.70	145
8	30	0.65	178	54	6.72	150
9	25	0.65	199	77	6.91	155
10	26	0.68	165	48	6.85	134

Jumlah sel-sel darah pada Kelompok Kontrol negatif

No	Hb g/dL	Lekosit $\times 10^3/\mu\text{L}$	Eritrosit $\times 10^6/\mu\text{L}$	diffcount Eos/Bas/Stab/Seg/Lym/Mon
1	11.8	5.3	4.40	0/ 0/ 1/ 21/ 77/ 1
2	13.5	5.1	5.10	1/ 0/ 2/ 19/ 74/ 4
3	15.0	3.8	8.30	2/ 0/ 2/ 23/ 71/ 2
4	13.5	10.2	6.20	1/ 0/ 0/ 15/ 84/ 0
5	13.2	5.2	6.60	0/ 0/ 0/ 23/ 74/ 3
6	14.4	5.7	7.20	1/ 0/ 1/ 22/ 75/ 1
7	13.3	3.8	6.80	2/ 0/ 3/ 14/ 78/ 3
8	12.6	3.0	4.70	0/ 0/ 2/ 23/ 71/ 4
9	15.6	6.4	8.60	1/ 0/ 0/ 15/ 82/ 2
10	10.3	5.2	3.80	2/ 0/ 0/ 29/ 69/ 0
11	11.7	9.0	4.90	1/ 0/ 2/ 55/ 38/ 4

Jumlah sel-sel darah pada Kelompok 1 Dosis Lazim

No	Hb g/dL	Lekosit $\times 10^3/\mu\text{L}$	Eritrosit $\times 10^6/\mu\text{L}$	diffcount Eos/Bas/Stab/Seg/Lym/Mon
1	13.0	3.9	5.10	1/ 0/ 1/ 18/ 76/ 4
2	14.7	3.2	7.70	0/ 0/ 0/ 12/ 81/ 7
3	14.6	10.4	7.10	0/ 0/ 0/ 24/ 72/ 4
4	13.9	6.2	6.90	0/ 0/ 0/ 15/ 83/ 2
5	14.0	10.2	7.20	0/ 0/ 0/ 30/ 68/ 2
6	13.9	3.5	7.20	1/ 0/ 0/ 10/ 87/ 2
7	13.5	6.2	6.90	0/ 0/ 0/ 16/ 81/ 3
8	14.3	10.8	7.90	0/ 0/ 0/ 35/ 61/ 4
9	14.5	6.0	7.10	0/ 0/ 0/ 25/ 73/ 2
10	11.8	3.7	4.40	0/ 0/ 0/ 7/ 93/ 0