

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)



STUDI TOKSISITAS SUB KRONIS EKSTRAK ETANOL 70%
DAUN *Justicia gendarussa* Burm. f. PADA TIKUS

(DATA PENDUKUNG UJI KLINIK KONFIRMATORI)
TAHUN KE-2 DARI RENCANA 2 tahun

TIM PENGUSUL:

1. Prof. Dr. Bambang Prajogo E.W., MS., Apt. (0017125602) (KETUA)
2. Prof. Dr. Gunawan Indrayanto., Apt. (0027034904) (ANGGOTA 1)
3. Dra. Rakhmawati, Apt. (0012125604) (ANGGOTA 2)

DIBIYAI OLEH :
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN
PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUDAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)



KKB
KK-2
LP.113/19
Bam
S

STUDI TOKSISITAS SUB KRONIS EKSTRAK ETANOL 70%
DAUN *Justicia gendarussa* Burm. f. PADA TIKUS

(DATA PENDUKUNG UJI KLINIK KONFIRMATORI)
TAHUN KE-2 DARI RENCANA 2 tahun

TIM PENGUSUL:

1. Prof. Dr. Bambang Prajogo E.W., MS., Apt. (0017125602) (KETUA)
2. Prof. Dr. Gunawan Indrayanto., Apt. (0027034904) (ANGGOTA 1)
3. Dra. Rakhmawati, Apt. (0012125604) (ANGGOTA 2)

DIBIYAI OLEH :
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN
PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUDAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



**STUDI TOKSISITAS SUB KRONIS EKSTRAK ETANOL 70%
DAUN *Justicia gendarussa* Burm. f. PADA TIKUS**

**(DATA PENDUKUNG UJI KLINIK KONFIRMATORI)
TAHUN KE-2 DARI RENCANA 2 tahun**

TIM PENGUSUL:

1. Prof. Dr. Bambang Prajogo E.W., MS., Apt. (0017125602) (KETUA)
2. Prof. Dr. Gunawan Indrayanto, Apt. (0027034904) (ANGGOTA 1)
3. Dra. Rakhmawati, Apt. (0012125604) (ANGGOTA 2)

**DIBIYAI OLEH :
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN
PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUDAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

UNIVERSITAS AIRLANGGA

NOVEMBER 2018




HALAMAN PENGANTAR

Judul	STUDI TOKSISITAS SUBSTANSI BENTONIT ETANOL 70% DALAM Sistem gastrointestinal (Rata, 1) PADAT TERBUK DUNTA FERDIKA NURDIYATI ALLENIA KOMPONEN PUNYI
Pembimbing I	Dr. Drs. BAMBANG PRAJOGO (A.C. BAMBANG)
Nama Lengkap	Liauwatun Airlangga
Program Studi	041121001
NIDN	000000000
Jabatan Fungsional	Asisten Ahli
Program Studi	Program Studi Profesi Apoteker
Tempat Kerja	001000000
Alamat email (e-mail)	Prasjojo_P@pafab.com
Anggota II	
Nama Lengkap	Dr. Drs. A. H. SULAWAN PURNAMA ANDO
NIDN	001000000
Program Studi	Liauwatun Airlangga
Anggota III	
Nama Lengkap	DR. BAMBANG PRAJOGO
NIDN	001000000
Program Studi	Liauwatun Airlangga
Asisten Ahli (jika ada)	
Nama Lengkap	
Alamat	
Pencapaian Gelar	
Tahun Pengetahuan	Tahun ke 2 dan semester 2 tahun
Skor Tahun Berjalan	Rp 30.000.000
Skor Ranselarian	Rp 30.000.000


 (Dr. Drs. A. H. Sulawan Purnama Ando)
 NIDN: 001000000

Kota Surabaya, 11 - 11 - 2018
 Ketua


 (Dr. Drs. Bambang Prajogo)
 NIDN: 001000000


 (Dr. Drs. Bambang Prajogo)
 NIDN: 001000000



RINGKASAN

Menurut laporan FDA (*Food and Drug Administration*) dalam *Poisonous Plant Database (Plant List)*, tanaman gandarusa termasuk salah satu tanaman yang potensial beracun. Berdasarkan penelitian sebelumnya, uji toksisitas akut menggunakan fase air dan fase etanol 60% daun gandarusa pada mencit menunjukkan hasil relatif tidak membahayakan. Selain itu, untuk uji toksisitas subakut pada kelinci juga tidak mempengaruhi parameter fungsi hati dan ginjal. Fase air dan fase etanol 60% daun gandarusa juga tidak mempunyai efek teratogenik pada mencit. Bahkan fase air juga tidak mempunyai efek karsinogenik yaitu tidak memberikan perubahan histopatologi pada testis, hati, ginjal, usus, dan paru mencit. Pada penelitian sebelumnya uji toksisitas sub kronis dengan menggunakan fase etanol 70% daun gandarusa pada hewan tikus tahap pertama didapatkan hasil bahwa tidak toksik. Uji toksisitas subkronis dilakukan dengan pemeriksaan makropatologi, biokimia klinis, dan histopatologi organ hati, ginjal, usus halus, limfa dan jantung tikus.

Tahap ke dua akan dilakukan metabolite profile darah dan masing masing organ tikus hasil dari uji toksisitas sub kronis, dengan menggunakan alat LC-MS/MS. Analisis metabolit dalam sampel darah berguna untuk mencari marker yang berpotensi toksik serta untuk mengetahui mekanisme toksisitas dari senyawa yang terbukti toksik. Diharapkan hasil dari metabolite profile menunjukkan bahwa tidak toksik.

PRAKATA

Dengan memanjatkan puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya, sehingga laporan penelitian **STUDI TOKSISITAS SUB KRONIS EKSTRAK ETANOL 70% DAUN *Justicia gendarussa* Burm. f. PADA TIKUS** telah dapat dilaksanakan sesuai dengan perencanaan.

Diharapkan penelitian ini dapat mempercepat terlaksananya penetapan dosis sediaan fitofarmaka kapsul gendarusa untuk kontrasepsi pria. Demikian atas perhatian dan kerjasamanya terutama penyandang dana, disampaikan terima kasih.

Surabaya, 30 Nopember 2018

Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	27
BAB 4. METODE PENELITIAN	28
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	35
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	128
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	129
LAMPIRAN	134



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Kriteria penggolongan sediaan uji menurut OECD pada tikus.....	10
2.2 Kriteria penggolongan sediaan uji.....	11
2.3 Kriteria hewan uji yang digunakan dalam uji toksisitas.....	14
5.1 Berat badan mencit pada uji toksisitas akut.....	35
5.2 Berat badan tikus pada uji toksisitas akut.....	36
5.3 Hasil olah data statistik biokimia darah tikus dengan SPSS.....	36
5.4 Hasil olah data statistik hematologi tikus dengan SPSS.....	36
5.5 Hasil Rf Profil Kromatogram Ekstrak Ginjal Tikus.....	39
5.6 Dosis ekstrak etanol 70% daun <i>justicia gendarussa</i> terfraksinasi yang diberikan kepada hewan coba.....	108
5.7 Hasil pengukuran tebal dinding alveoli pada pengamatan preparat histopatologi paru tikus.....	109
5.8 Hasil uji <i>pos hoc</i> pengukuran tebal dinding alveoli pada pengamatan preparat histologi paru tikus.....	110
5.9 Hasil pengukuran diameter pulpa putih pada pengamatan preparat histopatologi organ limpa tikus.....	112
5.10 Presentase hasil pengamatan gerak massa spermatozoa.....	113
5.11 Presentase hasil pengamatan gerak individu spermatozoa.....	115
5.12 Rata-rata presentase spermatozoa hidup.....	117
5.13 Rata-rata hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus.....	121
5.14 Rata-rata hasil pengukuran tebal tubulus seminiferus.....	123
5.15 Hasil perhitungan sel spermatogozit.....	125
5.16 Rata-rata hasil perhitungan sel Leydig.....	127

DAFTAR TABEL

Gambar	Halaman
2.1 Apigenin.....	5
2.2 Struktur molekul gendarusin A.....	5
2.3 Kerangka kerja pembuatan ekstrak 70% Daun <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f...	6
2.4 Reaksi enzimatis SGPT.....	19
2.5 Reaksi enzimatis SGOT.....	19
2.6 Diagram skematik dari instrumen LC-MS/MS.....	25
4.1 Skema kerja Uji Toksisitas	28
4.2 Profil kromatogram ekstrak ginjal	39
4.3 Hasil analisa LCMS organ ginjal.....	40
4.4 Hasil <i>overlay</i> LCMS organ ginjal.....	41
4.5 Hasil LCMS granul dan ekstrak <i>gendarussa</i>	41
5.1 Gambaran histopatologi paru dengan pewarnaan HE pada perbesaran 400x.....	109
5.2 Diagram batang rata-rata hasil pengukuran tebal dinding alveoli	110
5.3 Gambaran histopatologi limpa dengan pewarnaan HE pada perbesaran 400x.....	111
5.4 Diagram batang rata-rata hasil pengukuran diameter pulpa putih.....	112
5.5 Pengukuran diameter tubulus seminiferus pada preparat histologi pewarnaan HE perbesaran 100 X.....	119
5.6 Pengukuran tebal tubulus seminiferus pada preparat histologi perwanaaan HE perbesaran 400x	121
5.7 Perhitungan jumlah sel leydig pada preparat histopatologi perwanaaan HE perbesaran 400x	125

BAB 1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan tanaman yang secara empiris ataupun penelitian berkhasiat sebagai obat. Di sisi lain, dunia berada dalam iklim *back to nature* atau dikenal dengan gerakan kembali ke alam yang dalam pelaksanaannya membiasakan hidup dengan menghindari bahan-bahan kimia sintetis dan lebih mengutamakan bahan alami. Semua hal yang serba natural semakin digemari dan dicari orang, salah satunya adalah penggunaan tumbuhan untuk pengobatan.

Pemakaian tumbuhan untuk tujuan pencegahan dan pengobatan penyakit telah dikenal oleh manusia sejak dahulu. Pemakaiannya lebih berdasarkan pada pengalaman pribadi maupun pengalaman-pengalaman sebelumnya yang dikenal sebagai obat tradisional. Di Indonesia penggunaan obat tradisional masih banyak dilakukan dan hal ini sudah menjadi tradisi masyarakat di Indonesia sejak lama. Sampai saat ini masyarakat Indonesia masih menggunakan obat tradisional, bahkan ada kecenderungan hal tersebut meningkat, karena obat tradisional dianggap relatif tidak menimbulkan efek samping yang bermakna. *Trend back to nature* mengakibatkan semakin banyak penelitian yang dilakukan untuk mengembangkan potensi tumbuh-tumbuhan sebagai bahan baku obat.

Fenomena lain yang dihadapi Indonesia saat ini adalah laju pertumbuhan penduduk yang sangat tinggi, sehingga untuk menanggulangi hal tersebut, pemerintah menggalakkan program Keluarga Berencana (KB). Telah banyak metode kontrasepsi dengan macam kerugiannya. Peran suami dalam KB juga masih kecil karena metode kontrasepsi yang terbatas untuk suami. Dalam rangka peningkatan peran suami dalam program KB, perlu dikembangkan metode kontrasepsi yang efektif dan reversibel, tidak ada penurunan libido, dan tidak terjadi toksisitas pada pemakaian dosis terapi.

Salah satu tanaman obat Indonesia yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat kontrasepsi dalam hal ini adalah gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm. f.). Tanaman tersebut tersebar dari Jawa, ke Cina Selatan, Malaysia, dan Filipina (Heyne, 1987). Dari hasil survei di Papua, dilaporkan bahwa gandarusa dipergunakan oleh masyarakat setempat sebagai kontrasepsi pria (Moeso dan Agus, 1985).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui aktivitas gandarusa sebagai antifertilitas. Mekanisme utamanya adalah melalui hambatan enzim hialuronidase spermatozoa yang bersifat kompetitif dan reversibel. Enzim hialuronidase merupakan enzim yang terdapat pada bagian kepala (akrosom) spermatozoa (Gilbert, 1988). Seperti telah diketahui, sel telur mempunyai 3 lapisan, yaitu kumulus ooforus, korona radiata, dan

zona pelusida. Fertilisasi dapat terjadi jika spermatozoa dapat menembus ketiga lapisan tersebut. Enzim hialuronidase berfungsi untuk penetrasi spermatozoa pada cumulus oophorus, Corona Penetration Enzym pada korona radiata, akrosin pada zona pelusida. Ketiga enzim ini bekerja secara spesifik dan berurutan. Sehingga apabila aktivitas enzim hialuronidase dihambat, maka penetrasi spermatozoa tidak terjadi dan begitu juga pada proses fertilisasi (Zaneveld, 1976). Aktivitas hambatan enzim tersebut terutama disebabkan oleh kandungan senyawa flavonoid pada gandarusa.

Menurut laporan FDA (Food and Drug Administration) dalam Poisonous Plant Database (Plant List), tanaman gandarusa termasuk salah satu tanaman yang potensial beracun. Berdasarkan penelitian sebelumnya, uji toksisitas akut menggunakan fase air dan fase etanol 60% daun gandarusa pada mencit menunjukkan hasil relatif tidak membahayakan. Selain itu, untuk uji toksisitas subakut pada kelinci juga tidak mempengaruhi parameter fungsi hati dan ginjal. Fase air dan fase etanol 60% daun gandarusa juga tidak mempunyai efek teratogenik pada mencit. Bahkan fase air juga tidak mempunyai efek karsinogenik yaitu tidak memberikan perubahan histopatologi pada testis, hati, ginjal, usus, dan paru mencit. Akan tetapi berdasarkan penelitian Romzah, 2005, pemberian fase air selama 52 hari dapat menyebabkan perubahan histopatologi hati, erosi mukosa usus halus, tetapi tidak menunjukkan perubahan histopatologi ginjal. Oleh karena itu, sebelum digunakan sebagai obat perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas tanaman ini.

Pada penelitian ini akan dilakukan uji toksisitas dengan menggunakan fase etanol 70% daun gandarusa pada hewan tikus. Fase etanol 70% ini sudah dibebaskan dari alkaloid yang dicurigai berpengaruh terhadap efek toksik gandarusa. Uji toksisitas yang dilakukan yaitu uji subkronis. Sedangkan uji toksisitas subkronis dilakukan dengan pemeriksaan makropatologi, biokimia klinis, dan histopatologi organ hati, ginjal, usus halus, paru, limfa, dan jantung. Serta dilakukan pemeriksaan darah lengkap dan pemeriksaan biokimia klinis pada hati meliputi pemeriksaan pada aktivitas SGOT dan SGPT, sedangkan pada ginjal meliputi BUN dan kreatinin darah.

Perubahan metabolit dalam darah selama uji toksisitas subkronis juga diamati. Analisis metabolit dalam sampel darah berguna untuk mencari marker yang berpotensi toksik serta untuk mengetahui mekanisme toksisitas dari senyawa yang terbukti toksik. Dari hasil data toksisitas ini nantinya digunakan sebagai data pendukung uji klinis konfirmatori.

1.1 Tujuan Umum

Mengetahui marker yang berpotensi toksik serta untuk mengetahui mekanisme toksisitas dari senyawa yang terbukti toksik.

1.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui efek toksik ekstrak etanol 70% daun gandarusa terhadap histologi organ hati, ginjal, usus halus, paru, limfa dan jantung tikus.
2. Mengetahui profil metabolit plasma tikus yang mendapat ekstrak etanol 70% daun gandarusa.

1.3 Sasaran

Ekstrak etanol 70% daun gandarusa tidak toksik

1.4 Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian	
			2017	2018
1	Publikasi ilmiah ²⁾	Internasional	Ada	Ada
		Nasional Terakreditasi	-	-
2	Pemakalah dalam temu ilmiah ³⁾	Internasional	Ada	Ada
		Nasional	Ada	Ada
3	Invited speaker dalam temu ilmiah ⁴⁾	Internasional	-	-
		Nasional	Ada	Ada
4	Visiting Lecturer ⁵⁾	Internasional	-	Ada
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI) ⁶⁾	Paten	-	-
		Paten sederhana	-	-
		Hak Cipta	-	-
		Merek dagang	-	-
		Rahasia dagang	-	-
		Desain Produk Industri	-	-
		Indikasi Geografis	-	-
		Perlindungan Varietas Tanaman Perlindungan Topografi Sirkuit Terpadu	-	-
6	Teknologi Tepat Guna ⁷⁾	-	-	
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/ Rekayasa Sosial ⁸⁾	-	-	
8	Buku Ajar (ISBN) ⁹⁾	Ada	-	
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT) ¹⁰⁾	-	-	

1) TS = Tahun sekarang (tahun pertama penelitian)

2) Isi dengan tidak ada, draf, *submitted*, *reviewed*, *accepted*, atau *published*

3) Isi dengan tidak ada, draf, terdaftar, atau sudah dilaksanakan

4) Isi dengan tidak ada, draf, terdaftar, atau sudah dilaksanakan

5) Isi dengan tidak ada, draf, terdaftar, atau sudah dilaksanakan

6) Isi dengan tidak ada, draf, terdaftar, atau *granted*

7) Isi dengan tidak ada, draf, produk, atau penerapan

8) Isi dengan tidak ada, draf, produk, atau penerapan

9) Isi dengan tidak ada, draf, proses *editing*, atau sudah terbit

10) Isi dengan skala 1-9 dengan mengacu pada Bab 2 Tabel 2.7

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ekstrak Etanol 70% Daun *Justicia gendarussa* Burm.f.

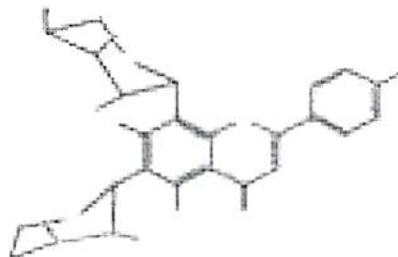
Pada ekstrak etanol 70% daun *Justicia gendarussa* Burm.f. ini terkandung 12 komponen flavonoid (glikosida flavonoid) dengan berat molekul yang sama dimana komponen mayor adalah gendarussin A atau 6,8-di-C- α -L-arabinopiranosil-4',5,7-trihidroksi-flavon sedangkan salah satu komponen minornya adalah gendarussin B yakni 6-C- α -l-arabinopiranosil-4',5,7-trihidroksi-8-C- β -D-silo-piranosilflavon. Gendarusin A termasuk dalam golongan apigenin (Prajogo, 2002).

Adapun aktivitas antifertilitas dari senyawa ini adalah (Dewanti, 2005) :

1. Perubahan pola ekspresi gen sehingga menurunkan sintesis enzim hyaluronidase yang diperlukan pada proses penetrasi spermatozoa ke dalam ovum.
2. Perubahan sekuen DNA pada gen sehingga menyebabkan perubahan struktur protein dan penurunan aktivitas enzim hyaluronidase.



Gambar 2.1 Apigenin



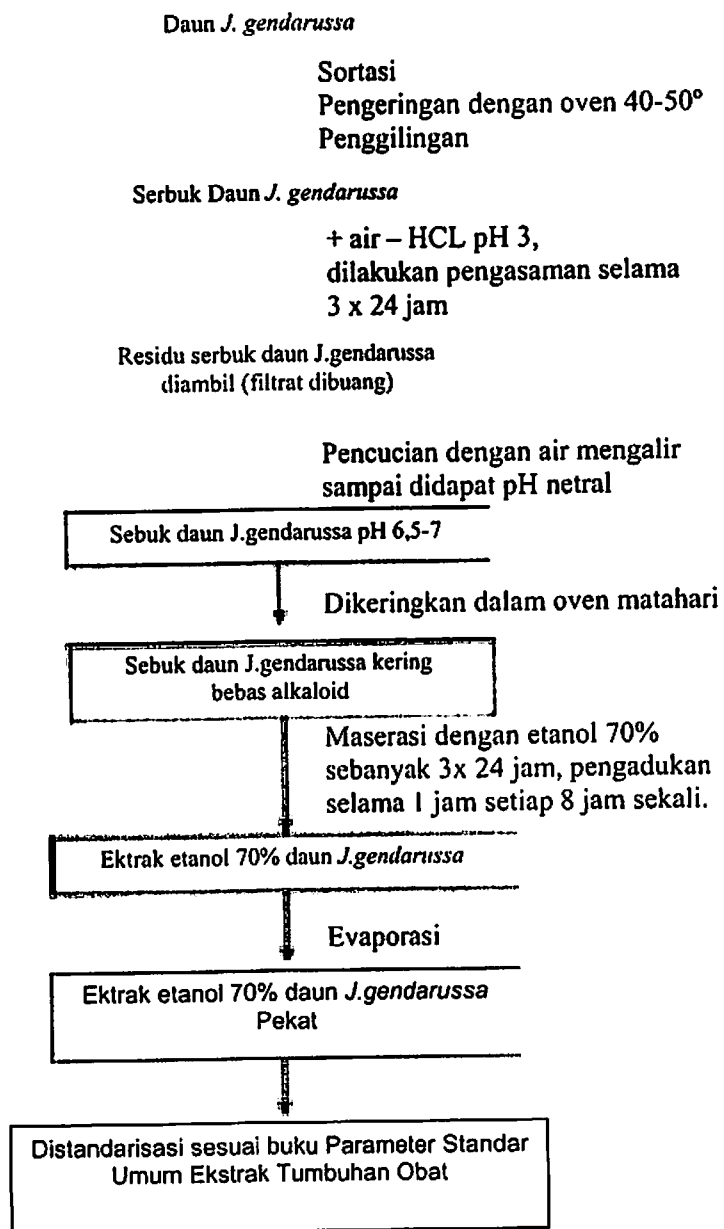
Gambar 2.2 Struktur molekul gendarusin A

Gendarusin A memiliki ikatan gula pada atom C nomor 6 dan 8 yakni berupa gugus arabinopiranosil yang membentuk ikatan C-glikosida dimana ikatan ini relatif lebih stabil terhadap asam dibandingkan flavonoid O-glikosida yang memiliki ikatan hemiasetal.

Selain itu, dengan adanya gugus gula ini mengakibatkan senyawa cenderung bersifat polar (Markham, 1988).



Pembuatan ekstrak etanol 70% daun *Justicia gendarussa* Burm.f. dapat dilihat pada gambar 2.3 dibawah ini.



Gambar 2.3 Kerangka kerja pembuatan ekstrak 70% Daun *Justicia gendarussa* Burm.f. (Prajogo, 2002)

Toksisitas Tanaman

Toksisitas gandarusa secara *in silico* dengan *ACD/I-Lab Online* menunjukkan bahwa senyawa flavonoid turunan apigenin berpotensi memiliki efek buruk yang dapat mempengaruhi *health effects*. Sedangkan prediksi toksisitas dengan *Osiris Property Explorer Online* didapatkan urutan senyawa yang memiliki *drug score* paling baik menuju paling buruk adalah Justidrusamid B > Justidrusamid A > 2-(2'-amino-benzil)-o-metil-benzil alkohol > 2-amino-o-metil benzil alkohol > Justidrusamid D > 2-(2'-amino-benzilamino) benzil alkohol > Justidrusamid C > 2-amino benzil alkohol > Gendarusin A=B=C=D=E. Justidrusamid B mempunyai potensi yang baik sebagai obat karena memiliki *drug score* yang tinggi. Selain itu, prediksi toksisitas dengan *Toxtree Offline* didapatkan, senyawa alkaloid 2-amino benzil alkohol dan 2-(2'-amino-benzilamino) benzil alkohol memiliki potensi sifat karsinogen (Ekaputri, 2015).

Uji toksisitas fase air *Justicia gendarussa* terhadap sel limfosit normal manusia secara *in vitro* mempunyai harga LC50 3215,7242 ppm, yang artinya fase air ini tidak memiliki aktivitas toksik (Nihayah, 2005).

Uji toksisitas akut menunjukkan bahwa LD50 pada pemberian oral fraksi etanol 60% dan fraksi air daun gandarusa pada mencit adalah 17,82630 g/kg BB dan 15,63389 g/kg BB yang artinya relatif tidak membahayakan (Supriatin, 2003).

Uji toksisitas subakut fase air daun gandarusa pada kelinci jantan dengan parameter kimia darah menunjukkan bahwa pada dosis 579,48 mg/kg BB, 482,90 mg/kg BB, dan 340,87 mg/kg BB selama 15 hari tidak mempengaruhi ALT (SGPT), AST (SGOT), ALP (Fosfatase Alkali), BUN, dan kreatinin (Febriyanti, 2006).

Uji teratogenik menunjukkan bahwa fraksi etanol 60% dan fraksi air daun gandarusa tidak mempunyai efek teratogenik pada mencit dengan dengan dosis masing-masing 0,59; 1,18; 3,54; 5,90 g/kg BB untuk fraksi etanol dan 0,35; 0,70; 2,10; 3,50 g/kg BB untuk fraksi air (Supriatin, 2003).

Pemberian fraksi air daun *J. gendarussa* per oral dengan dosis 579,48; 482,90; dan 340,87 mg/kg BB pada kelinci jantan tidak mempengaruhi kadar Na⁺, K⁺, Cl⁻, kalsium, glukosa (Nuryantie, 2006).

Uji karsinogenik menunjukkan bahwa fase air daun gandarusa tidak menyebabkan efek karsinogenik (tidak memberikan perubahan histopatologi) pada testis, hati, ginjal, usus, dan paru-paru mencit jantan pada dosis 62,5 mg/20g BB; 31,3 mg/20 g BB; dan 15,6 mg/20g BB selama 6 bulan (Putriani, 2007).

Uji pengaruh pemberian fase air daun gandarusa terhadap gambaran histopatologi hati, ginjal, dan usus halus dengan dosis 1/20, 1/40, 1/80, dan 1/160 LD50 312,67 mg/20g

BB mencit yang dilakukan pada mencit jantan menunjukkan hasil yang beragam. Pemberian fase air daun gandarusa pada mencit jantan selama 52 hari dengan dosis 15,6335 mg/20g BB dan 7,8168 mg/20g BB dapat menyebabkan perubahan gambaran histopatologi hati berupa adanya degenerasi sel seluas 50-75% dari lapangan pandang. Dan pada dosis 15,6335 mg/20g BB juga menyebabkan erosi pada mukosa usus halus seluas antara 50-75% lapangan pandang. Sedangkan pada pemeriksaan histopatologi ginjal tidak menunjukkan adanya perubahan (Romzah, 2005).

2. 2 Tinjauan Toksisitas

Uji toksisitas adalah suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis-respon yang khas darisediaan uji. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberi informasimengenai derajat bahaya sediaan uji tersebut bila terjadi pemaparan padamanusia, sehingga dapat ditentukan dosis penggunaannya demi keamananmanusia.

Uji toksisitas menggunakan hewan uji sebagai model berguna untukmelihat adanya reaksi biokimia, fisiologik dan patologik pada manusiaterhadap suatu sediaan uji. Hasil uji toksisitas tidak dapat digunakan secaramutlak untuk membuktikan keamanan suatu bahan/ sediaan pada manusia,namun dapat memberikan petunjuk adanya toksisitas relatif dan membantuidentifikasi efek toksik bila terjadi pemaparan pada manusia.

Tujuan Studi Toksisitas

Banyak manfaat yang dapat diperoleh dari studi toksisitas (Ghosh, 1971; Loomis, 1978). Manfaat tersebut antara lain adalah untuk mendapatkan gejala-gejala yang timbul akibat pemberian obat, mengetahui batas keamanan obat, dan untuk mengetahui derajat kematian hewan coba akibat pemberian obat.

Dari hasil-hasil tersebut diatas, akan dapat dilakukan evaluasi obat dalam bidang medis. Selain itu juga dapat menunjukkan organ sasaran (misalnya hati), sistem (misalnya sistem kardiovaskular), atau toksisitas khusus (misalnya karsinogenitas) yang membutuhkan penelitian lebih lanjut (Lu, 1995).

Macam Studi Toksisitas

Bahaya akibat pemaparan suatu zat pada manusia dapat diketahui dengan mempelajari efek kumulatif, dosis yang dapat menimbulkan efek toksik pada manusia, efek karsinogenik, teratogenik, mutagenic, dan lain-lain. Pada umumnya informasi tersebut dapat diperoleh dari percobaan menggunakan hewan uji sebagai model yang dirancang pada serangkaian uji toksisitas yang meliputi uji toksisitas akut oral, toksisitas subkronis

oral, toksisitas kronis oral, teratogenisitas, sensitisasi kulit, iritasi mata, iritasi akut dermal, iritasi mukosa vagina, toksisitas akut dermal, dan toksisitas subkronis dermal. Pemilihan uji tersebut tergantung dari tujuan penggunaan suatu zat dan kemungkinan terjadinya resiko akibat pemaparan pada manusia (BPOM, 2014).

Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji yang diberikan dalam dosis tunggal, atau dosis berulang yang diberikan dalam waktu 24 jam. Apabila pemberian dilakukan secara berulang, maka interval waktu tidak kurang dari 3 jam.

Sebagian besar penelitian semacam ini dirancang untuk menentukan dosis letal median (LD50) toksikan, menunjukkan organ sasaran yang mungkin dirusak dan efek toksik spesifiknya, serta memberikan petunjuk tentang dosis yang sebaiknya digunakan dalam pengujian yang lebih lama (Lu, 1995). Biasanya terlebih dahulu dilakukan range finding test sebelum mengamati gejala pada hewan coba untuk mendapatkan tolak ukur dosis penyebab kematian. Cara pemberian harus diberikan melalui jalur yang biasa digunakan pada manusia, biasanya pemberian per oral. Dosis diberikan sekali atau beberapa kali dalam jangka waktu 24 jam. Setelah selang waktu 7-14 hari kemudian, atau 24 jam kemudian diamati gejala yang terjadi pada hewan coba. Gejala yang dimaksud adalah jumlah hewan yang mati, waktu kematian dan tanda-tanda toksisitasnya untuk memperkirakan LD50. Otopsi kasar perlu dilakukan pada semua hewan yang mati dan pada beberapa hewan yang hidup terutama hewan yang tampak sakit pada akhir percobaan. Otopsi dapat memberikan informasi yang berharga tentang organ sasaran, terutama bila kematian tidak terjadi dengan segera setelah pemberian obat (Andreas *et al.*, 1992 ; Lu, 1995). LD50 merupakan dosis tunggal suatu zat yang secara statistik diharapkan akan membunuh 50% hewan coba. Nilai LD50 berguna untuk mengevaluasi efek keracunan yang tidak disengaja, mengklasifikasi zat kimia sesuai dengan toksisitas relatifnya, dan untuk perencanaan penelitian toksisitas sub akut dan kronis pada hewan. Selain itu, nilai LD50 dapat memberikan informasi tentang reaktivitas suatu populasi hewan; memberikan informasi tentang mekanisme toksisitas, pengaruh umur, seks, faktor individu, faktor lingkungan, variasi respon antar spesies dan antar strain hewan; dan memberi sumbangan informasi yang dibutuhkan dalam merencanakan pengujian obat pada manusia dan dalam pengendalian mutu zat kimia; serta untuk deteksi pencemaran toksik serta perubahan fisik yang mempengaruhi. LD50 juga berguna untuk uji bioavailabilitas (Lu, 1995).

Hasil toksisitas akut dievaluasi berdasarkan kriteria bahaya dari GHS (*Gobally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*) yang tercantum dalam *Thirteenth Addendum to The OECD Guidelines for The Testing of Chemical* (2001). Kriteria penggolongan menurut OECD (*Organization of Economic Cooperation and Development*) digunakan untuk penentuan kategori toksisitas akut bahan kimia seperti pestisida serta untuk pelabelannya.

Tabel 2.1 Kriteria penggolongan sediaan uji menurut OECD pada tikus

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

Untuk obat, obat tradisional, dan bahan lainnya (*Generally Recognized As Safe/ GRAS*) seperti bahan pangan, penentuan kategori toksisitas akut digunakan penggolongan seperti pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Kriteria penggolongan sediaan uji (Hodge dan Sterner, 1995)

Tingkat Toksisitas	Kategori	LD ₅₀ Oral (Pada Tikus)
1	Sangat toksik	≤ 1 mg/kg BB
2	Toksik	1-50 mg/kg BB
3	Cukup toksik/ Toksik sedang	50-500 mg/kg BB
4	Sedikit toksik/ Toksik ringan	0,5-5 g/kg BB
5	Praktis tidak toksik	5-15 g/kg BB
6	Relatif tidak membahayakan	> 15 g/kg BB

Toksisitas Subkronis

Uji toksisitas subkronis oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan secara oral pada hewan uji selama sebagian umur hewan, tetapi tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan.

Prinsip dari uji toksisitas subkronis oral adalah sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok selama 28 atau 90 hari, bila diperlukan ditambahkan kelompok satelit untuk melihat adanya efek tertunda atau efek yang bersifat *reversibel*. Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas. Hewan yang mati selama periode pemberian sediaan uji, bila belum melewati periode *rigor mortis* (kaku) segera diotopsi, dan organ serta jaringan diamati secara makropatologi dan histopatologi. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup diotopsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ dan jaringan. Selain itu juga dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis dan histopatologi.

Tujuan uji toksisitas subkronis oral adalah untuk memperoleh informasi adanya efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut; informasi kemungkinan adanya efek toksik setelah pemaparan sediaan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu; informasi dosis yang tidak menimbulkan efek toksik (*No Observed Adverse Effect Level* / NOAEL); dan mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas zat tersebut (BPOM, 2014).

Ketentuan Umum pada Uji Toksisitas

1. Sediaan Uji

Hasil uji toksisitas sangat tergantung pada sifat zat yang diuji. Sediaan uji untuk uji toksisitas berupa zat yang dapat larut atau tersuspensi dalam air atau dapat larut dalam minyak, yang dapat berasal dari tanaman, hewan, maupun hasil sintesis organik.

2. Penyiapan Sediaan Uji

Sediaan uji dapat dibuat dengan bermacam-macam cara, sesuai dengan sifat sediaan uji dan cara pemberiannya. Sediaan uji dapat berupa:

1. Formulasi dalam media cair

Ada beberapa cara penyiapan sediaan uji dalam media cair, yaitu pertama jika sediaan uji larut dalam air, sediaan uji harus dibuat dalam bentuk larutan dalam air. Kedua, jika sediaan uji tidak larut dalam air, sediaan uji dibuat dalam bentuk suspensi menggunakan gom arab 3 - 5%, CMC (*carboxy methyl cellulose*) 0,3 - 1,0% atau dengan zat pensuspensi lain yang inert secara farmakologi. Dan ketiga, apabila tidak dapat dilakukan dengan cara - cara tersebut, sediaan uji dilarutkan dalam minyak yang tidak toksik, misalnya minyak zaitun atau minyak jagung.

2. Campuran pada makanan

Pada uji toksisitas dengan pemberian berulang seperti pada uji toksisitas subkronis, dengan pertimbangan kepraktisan, sediaan uji dapat diberikan dengan mencampur dalam makanan atau minuman hewan uji. Dosis yang diberikan harus tetap, berdasarkan berat badan dan perhitungan jumlah makanan dan minuman yang dikonsumsi setiap hari.

3. Sediaan uji simplisia tanaman obat

Pembuatan sediaan uji simplisia tanaman obat dibuat seperti penggunaan pada manusia atau cara lain yang sesuai, misalnya penyarian dengan etanol. Penyarian menggunakan air dapat dilakukan dengan cara diseduh, direbus atau dengan cara penyarian yang lain selama dapat menjamin tersarinya kandungan simplisia secara sempurna. Pada pemekatan untuk mencapai dosis yang diinginkan, maka suhu pemanasan tidak boleh menyebabkan berkurangnya kandungan zat berkhasiat. Simplisia yang mengandung minyak atsiri, penyiapan dan pemekatan sediaan uji dilakukan dalam wadah tertutup dan dilakukan penyaringan setelah dingin. Penyarian dengan menggunakan etanol dapat dilakukan dengan cara dingin,

misalnya maserasi, perkolasi, atau dengan cara panas misalnya direbus, disoksetasi, direfluks dan selanjutnya disaring kemudian diuapkan untuk menghilangkan etanol dan sisa penguapan dilarutkan dalam air dan disuspensikan menggunakan tragakan 1-2%, CMC 1-2% (sesuai kebutuhan), atau bahan pensuspensi lain yang sesuai.

Dosis Uji

Dosis uji harus mencakup dosis yang setara dengan dosis penggunaan yang lazim pada manusia. Dosis lain meliputi dosis dengan faktor perkalian tetap yang mencakup dosis yang setara dengan dosis penggunaan lazim pada manusia sampai mencapai dosis yang dipersyaratkan untuk tujuan pengujian atau sampai batas dosis tertinggi yang masih dapat diberikan pada hewan uji.

Kelompok Kontrol

Pada setiap percobaan digunakan kelompok kontrol yang diberi pelarut/ pembawa sediaan uji dan digunakan juga kelompok kontrol tanpa perlakuan tergantung dari jenis uji toksisitas.

Cara Pemberiaan Sediaan Uji

Pada dasarnya pemberian sediaan uji harus sesuai dengan cara pemberian atau pemaparan yang diterapkan pada manusia misalnya peroral (PO), topikal, injeksi intravena (IV), injeksi intraperitoneal (IP), injeksi subkutan (SK), injeksi intrakutan (IK), inhalasi, melalui rektal dan lain-lain.

Hewan Uji

Pada prinsipnya jenis hewan yang digunakan untuk uji toksisitas harus dipertimbangkan berdasarkan sensitivitas, cara metabolisme sediaan uji yang serupa dengan manusia, kecepatan tumbuh serta mudah tidaknya cara penanganan sewaktu dilakukan percobaan. Hewan pengerat merupakan jenis hewan yang memenuhi persyaratan tersebut diatas, sehingga paling banyak digunakan pada uji toksisitas. Hewan yang digunakan harus sehat; asal, jenis, dan galur, jenis kelamin, usia serta berat badan harus jelas. Biasanya digunakan hewan muda dewasa, dengan variasi bobot tidak lebih dari 20%.

Adapun kriteria hewan yang digunakan dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 2.3 Kriteria hewan uji yang digunakan dalam uji toksisitas

No	Jenis Hewan	Bobot Minimal	Rentang Umur
1	Mencit	20 g	6-8 minggu
2	Tikus	120 g	6-8 minggu
3	Marmut	250 g	4-5 minggu
4	Kelinci	1800 g	8-9 Bulan

Pemeliharaan Hewan Uji

Ruangan yang digunakan untuk percobaan hendaknya memenuhi persyaratan suhu, kelembaban, cahaya dan kebisingan yang sesuai dengan kebutuhan hidup hewan uji, yaitu suhu ruangan diatur menjadi $22^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$, dengan kelembaban relatif 30–70%, dan penerangan 12 jam terang 12 jam gelap. Ruangan harus selalu dijaga kebersihannya. Hewan diberi pakan yang sesuai standar laboratorium dan diberikan tanpa batas (*ad libitum*).

Hewan dipelihara dalam kandang yang terbuat dari material yang kedap air, kuat dan mudah dibersihkan, ruang pemeliharaan bebas dari kebisingan. Luas area kandang per ekor hewan menurut *Cage Space Guidelines For Animals Used In Biomedical Research* (2008) yaitu untuk mencit (berat 15-25 g) dengan luas alas kandang 77,4 cm² dan tinggi 12,7 cm; tikus (berat 100-200 g) dengan luas alas kandang 148,4 cm² dan tinggi 17,8 cm; serta kelinci (berat 2-4 kg) dengan luas alas kandang 270 cm² dan tinggi 40,64 cm; serta marmut (berat 300-350 g) dengan luas alas kandang 387 cm² dan tinggi 17,18 cm.

Cara Mengorbankan Hewan Uji

Ada beberapa cara mengorbankan hewan uji pada uji toksisitas. Pada prinsipnya hewan uji dikorbankan sesuai dengan kaidah-kaidah cara dan teknik pengorbanan hewan sesuai dengan *ethical clearance* deklarasi Helsinki serta tidak mempengaruhi hasil uji toksisitas.

Sebelum hewan uji dikorbankan, dilakukan anestesi terlebih dahulu (eutanasi). Hewan dipegang secara hati-hati tanpa menimbulkan rasa takut, lalu hewan dikorbankan dengan salah satu teknik mengorbankan hewan di suatu tempat terpisah dan dijaga agar tidak ada hewan hidup di sekitarnya.

Teknik mengorbankan hewan uji ada beberapa cara antara lain: cara dislokasi leher untuk hewan kecil seperti mencit, tikus; cara anestesi secara inhalasi atau penyuntikan; cara pengeluaran darah melalui vena jugularis atau arteri karotis.

2.3 Tinjauan tentang Hati

Gambaran Umum

Hati merupakan organ terbesar dalam tubuh manusia, dengan berat 1200-1500 gram. Pada orang dewasa berat hati $\pm 1/50$ berat badan, sedangkan pada bayi sedikit lebih besar yaitu $1/18$ berat badan. Hati terbagi menjadi dua lobus kanan dan lobus kiri. Kedua lobus tersebut dipisahkan oleh ligamentus fasiforme. Pada bagian inferior terdapat fisura untuk ligamentus teres dan pada bagian posterior terdapat fisura untuk ligamentus venosum (Hadi, 2002).

Unsur-unsur struktural utama hati adalah sel-sel hati atau hepatosit. Sel-sel epitel ini berkelompok dalam lempeng-lempeng yang saling berhubungan yaitu lobulus. Dasar unit fungsional hati adalah lobulus hati yang merupakan struktural silindris dengan panjang beberapa milimeter dan garis tengah 0,8-2 mm. Hati manusia mengandung 50-100 ribu lobulus (Guyton & Hall, 1997).

Lobulus hati terbentuk mengelilingi sebuah vena sentralis yang bermuara ke dalam vena hepatica dan kemudian ke dalam vena cava. Lobulus sendiri dibentuk terutama dari banyak lempeng sel hati yang memancar secara sentrifugal dari vena sentralis seperti jeruji roda. Masing-masing lempeng hati tebalnya satu sampai dua sel, dan diantara sel-sel yang berdekatan terdapat kanalikuli biliaris kecil yang mengalir ke duktus biliaris di dalam septum fibrosa yang memisahkan lobulus hati yang berdekatan (Guyton dan Hall, 1997).

Dalam septa juga terdapat venula porta kecil yang menerima darah terutama dari vena saluran pencernaan melalui vena porta. Dari venula ini darah mengalir ke sinusoid hati gepeng dan bercabang yang terletak diantara lempeng-lempeng hati dan kemudian masuk vena sentralis. Dengan demikian, sel hati terus menerus terpapar dengan darah vena porta (Guyton dan Hall, 1997).

Selain vena porta, juga ditemukan arteriol hati di dalam septum interlobularis. Arterol ini menyuplai darah arteri ke jaringan septum diantara lobulus yang berdekatan, dan banyak arteriol kecil juga mengalir langsung ke sinusoid hati, paling sering pada sepertiga jarak ke septum interlobularis (Guyton dan Hall, 1997).

Sinusoid vena dibatasi oleh dua jenis sel yaitu sel endotel dan sel kupfer besar yang merupakan makrofag jaringan (sel retikoloendotel), yang mampu menjaga fagositosis bakteri dan benda asing lain dalam darah sinus hepaticus. Lapisan endotel sinusoid vena mempunyai pori yang sangat besar, beberapa diantaranya berdiameter hampir 1 mikrometer. Di bawah lapisan ini, terletak diantara sel endotel dan sel hepar, terdapat ruang jaringan yang sangat sempit yang disebut ruang disse. Jutaan ruang disse kemudian

menghubungkan pembuluh limfe di dalam septum interlobularis. Kelebihan cairan di dalam ruang ini dikeluarkan melalui cairan limfatik (Guyton dan Hall, 1997).

Sel hepar mengandung berbagai enzim, beberapa di antaranya penting untuk diagnostik karena dialirkan ke pembuluh darah, aktivitasnya dapat diukur sehingga dapat menunjukkan adanya penyakit hati atau tingkat keparahannya. Enzim-enzim ini adalah Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), dan γ -glutamyltransferase (γ -GT).

Seluruh sel dalam hepar memiliki kemampuan untuk regenerasi. Sel hepar tergolong sel yang stabil. Dalam keadaan normal sel hepar tidak mengalami replikasi, tetapi apabila hepar mengalami cedera, sel terangsang untuk replikasi. Kemudian regeneratif ini sangat vital bagi penderita fase penyembuhan kerusakan hepar akibat infeksi virus, obat atau trauma. Apabila terjadi kerusakan hepar yang menetap (persisten) atau berulang, struktur asiner atau tubuler normal akan hilang dan diganti oleh nodul sel hepar regeneratif yang fungsinya menjadi tidak efisien. Keadaan ini disebut sirosis (Underwood, 1996).

Fungsi Hati

Hati merupakan organ terbesar dalam tubuh yang mempunyai fungsi paling banyak dan paling kompleks. Hati penting untuk mempertahankan hidup dan berperan pada hampir setiap fungsi metabolisme tubuh. Hati juga berperan dalam mengubah zat toksik menjadi non toksik dan menjadikannya lebih larut air agar lebih mudah diekskresikan. Adapun fungsi utama hati adalah sintesa protein, sekresi empedu, dan penyimpanan metabolit. Fungsi metabolik lemak, protein, dan karbohidrat, serta detoksifikasi dan inaktivasi juga merupakan fungsi utama hati.

Tes Gangguan Fungsi Hati

Tes fungsi hati dapat dilakukan berdasarkan mikroskopi anatomi meliputi biopsi sel hati; fungsi biokimiawi meliputi metabolisme protein, karbohidrat, dan lemak; sekresi dan ekskresi meliputi pigmen empedu dan pengeluaran zat-zat asing; aktivitas enzim meliputi enzim transaminase, enzim fosfatase alkali, dan lain-lain.

Dari keempat jenis tes fungsi hati, yang paling sering digunakan dan lebih praktis adalah tes berdasarkan aktivitas enzim transaminase yang terdiri dari Serum Glutamat Piruvat Transaminase (SGPT) dan Serum Glutamat Oksaloasetat Transaminase (SGOT). Pemeriksaan enzim transaminase sudah dapat memberikan informasi adanya kerusakan sel hati (Coles, 1986).

Histopatologi Hati

Pemeriksaan mikroskopis sel hati dapat dilihat dari adanya degenerasi sel, pendarahan, dan nekrosis. Kerusakan sel dapat terjadi pada inti ataupun sitoplasma. Kerusakan yang terjadi pada sitoplasma disebut degenerasi sel. Degenerasi adalah perubahan morfologi akibat jejas yang non frontal dan perubahan tersebut masih dapat pulih kembali (reversibel). Degenerasi sel terjadi karena hilangnya pengaturan volume pada bagian-bagian sel. Dalam rangka menjaga kestabilan lingkungan interna sel, maka sel harus dapat mengeluarkan energi metabolik untuk memompa ion natrium. Produksi energi tersebut dilakukan oleh mitokondria. Zat-zat toksik dapat mengganggu metabolisme energi dalam sel sehingga sel tidak mampu memompa ion natrium yang cukup dan terjadi peningkatan konsentrasi natrium dalam sel serta peningkatan influks air ke dalam sel. Akibatnya terjadi pembengkakan sel.

Degenerasi juga bisa disebabkan karena adanya penimbunan lipid di dalam sel, terutama sel hati. Adanya degenerasi sel yang terus-menerus dan berlangsung cukup lama maka sel akan mencapai suatu titik dimana ia tidak dapat lagi mengkompensasi dan tidak dapat melangsungkan metabolisme sehingga terjadi kematian sel atau nekrosis sel (Price and Wilson, 1984). Nekrosis adalah kematian sel jaringan tubuh yang bersifat irreversibel dan merupakan tingkat lanjut dari degenerasi sel. Perubahan morfologi yang nyata pada inti sel dapat berupa piknosis, karyoreksis, dan karyolisis. Piknosis berupa pengumpulan kromatin sehingga inti sel berkerut dan tampak gelap. Karyoreksis berupa pecahnya selaput inti dengan fragmentasi intinya. Sedangkan, karyolisis berupa melarutnya seluruh inti sel.

Macam-macam degenerasi menurut Robbins dan Kumar yaitu degenerasi keruh, degenerasi hidrofik, dan degenerasi lemak. Pada degenerasi keruh terjadi pembengkakan sel oleh penimbunan air dan metabolit dalam sitoplasma sehingga tampak keruh. Apabila penimbunan air dan metabolit dalam sitoplasma lebih banyak sehingga terbentuk vakuola-vakuola, maka keadaan ini dikategorikan sebagai degenerasi hidrofik. Sedangkan degenerasi lemak adalah pembengkakan sel dengan penimbunan lemak dalam sitoplasma (Robbins and Kumar, 1992).

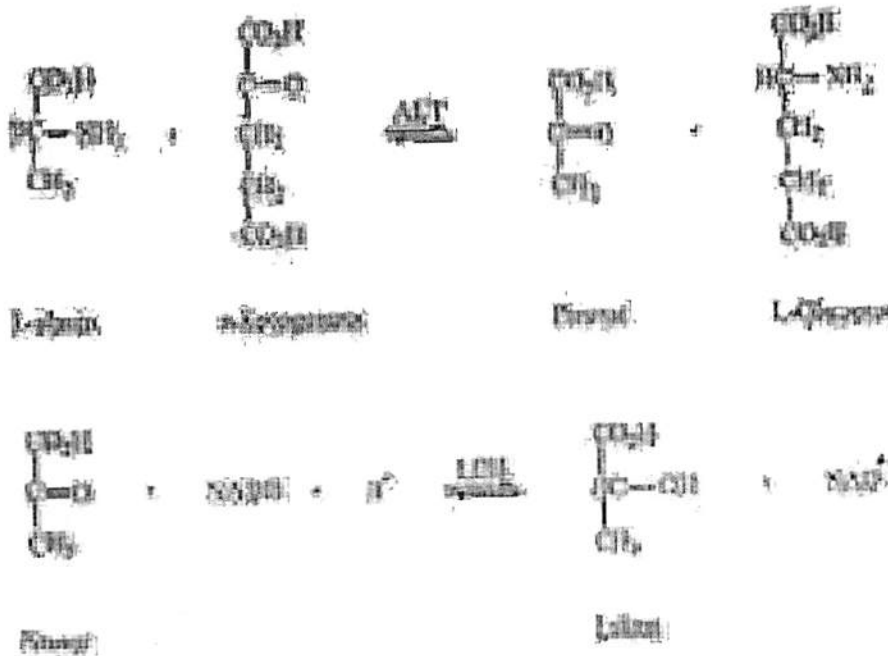
Enzim Alanin Aminotransferase (ALT/GPT)

Alanin Aminotransferase (Glutamat Piruvat Transaminase) termasuk bagian dari enzim transaminase yang mengkatalisis konversi asam amino menjadi asam α -keto melalui transfer gugus amino, GPT juga mengkatalisis proses sebaliknya. Aktivitas tertinggi ada di hati, aktivitas minor bisa terdeteksi di ginjal, jantung, otot bergaris, pankreas, limpa, dan

paru-paru. Dalam jantung dan otot-otot skelet agak kurang jika dibandingkan dengan GOT.

Peningkatan enzim transaminase mengindikasikan adanya infark miokard, hepatopati, distrofi otot, dan kerusakan organ dalam. Peningkatan aktivitas GPT dalam darah merupakan indikator yang spesifik dari kerusakan parenkim hati, dibandingkan dengan GOT.

Prinsip reaksi penentuan kadar enzim SGPT adalah Glutamat Piruvat Transaminase mengkatalisis reaksi antara α -ketoglutarat dengan L-alanin menghasilkan suatu asam piruvat dan asam L-glutamat. Asam piruvat yang terbentuk, dengan adanya LDH, akan direduksi menjadi asam laktat, bersamaan dengan itu NADH menjadi NAD⁺. NADH diabsorpsi pada panjang gelombang 340 nm. Kecepatan penurunan absorpsi pada panjang gelombang tersebut sebanding dengan aktivitas SGPT. Persamaan reaksi yang digunakan untuk menentukan aktivitas enzim SGPT ditunjukkan pada gambar di bawah ini (Amadea, 1987).



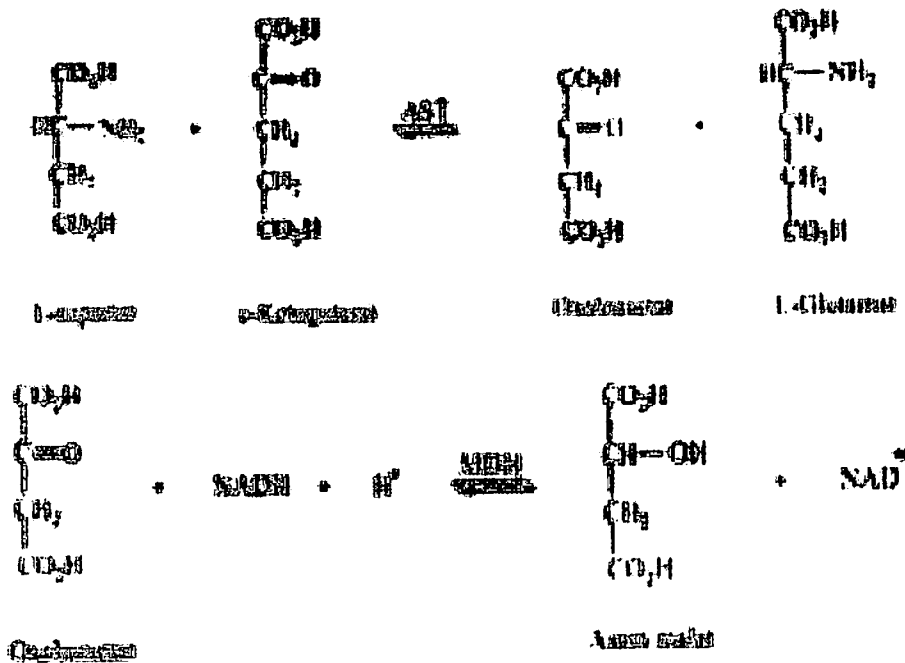
Gambar 2.4 Reaksi enzimatik SGPT

Enzim Aspartat Aminotransferase (AST/GOT)

Aspartat amino transferase (Glutamat Oksaloasetat Transaminase) termasuk enzim transaminase yang mengkatalisis konversi asam amino menjadi asam α -keto melalui transfer gugus amino. Aspartat amino transferase biasa ditemukan di jaringan manusia. Pada otot jantung juga ditemukan aktivitas dari enzim ini, aktivitas signifikan juga dapat

terlihat di otak, hati, mukosa lambung, jaringan adipose, otot bergaris, dan ginjal. GOT ada di sitoplasma dan mitokondria sel. Peningkatan enzim transaminase terdapat pada infark miokard, penyakit hati, distrofi otot, dan kerusakan organ.

Prinsip reaksi penentuan kadar enzim SGOT adalah Glutamat Oksaloasetat Transaminase mengkatalisis reaksi antara asam α -ketoglutarat dengan asam L-aspartat menghasilkan suatu asam oksaloasetat dan asam L-glutamat. Asam oksaloasetat yang terbentuk, dengan adanya MDH, akan direduksi menjadi asam malat, bersamaan dengan itu NADH menjadi NAD⁺. NADH diabsorbsi pada panjang gelombang 340 nm. Kecepatan penurunan absorpsi pada panjang gelombang tersebut sebanding dengan aktivitas SGOT. Persamaan reaksi yang digunakan untuk menentukan aktivitas enzim SGOT ditunjukkan pada gambar berikut di bawah ini (Amadea, 1987).



Gambar 2.5 Reakzi enzimatis SGOT

2.4 Tinjauan tentang Ginjal

Gambaran Umum

Ginjal merupakan alat tubuh yang mempunyai daya saring dan daya serap kembali. Penyaringan berdasarkan faktor-faktor osmotik. Ginjal menerima darah 15-25% dari curah jantung. Jumlah ini lebih besar jika dibandingkan dengan organ-organ lainnya. Aliran darah

pada korteks ginjal jauh lebih banyak daripada aliran darah dalam medulla (Kaneko, 1980). Arteriol-arteriolnya pendek, cabang langsung dari arteria-arteria interlobularis, masing-masing menjadi cabang-cabang kapiler yang banyak untuk membentuk lempeng pembuluh yang terdapat dalam glomerulus. Kapiler-kapiler bergabung membentuk arteriol eferen yang selanjutnya terbagi menjadi kapiler-kapiler yang mendarahi tubulus sebelum mengalir ke dalam vena interlobularis (Ganong, 1990).

Ginjal diliputi oleh kapsula ginjal yang terdiri atas jaringan penyambung padat, mempunyai bagian luar korteks dan bagian dalam medulla. Medula ginjal terdiri dari 10-18 struktur yang berbentuk kerucut atau piramid yang dasar dan pinggirnya berada dalam zona korteks dan puncaknya menonjol ke dalam kaliks. Korteks menduduki raung antara piramid dan dasar piramid. Korteks ginjal terutama terdiri atas nefron, medula, dan tubulus koligen dengan struktur yang berbeda.

Bagian-bagian dari ginjal yaitu:

1. Nefron

Nefron merupakan unit fungsional ginjal. Dalam tiap ginjal terdapat sekitar satu juta nefron yang pada dasarnya mempunyai struktur dan fungsi yang sama. Setiap nefron terdiri dari kapsula bowman yang mengitari rumbai kapiler glomerulus, tubulus kontortus proksimal, lengkung Henle, dan tubulus kontortus distal.

2. Glomerulus

Glomerulus terdiri atas kapsula bowman dan rumbai kapiler. Glomerulus dibentuk oleh sekelompok kapiler-kapiler ke dalam ujung nefron yang melebar. Kapiler-kapiler diberi darah oleh arteri aferen. Tekanan darah di dalam glomerulus menyebabkan cairan difiltrasi ke dalam kapsula bowman. Kemudian dari sini mengalir ke dalam tubulus proksimal yang terletak pada korteks ginjal.

3. Tubulus kontortus proksimal

Struktur ini merupakan segmen awal dari nefron yang berkelok-kelok yang timbul pada katub urinaris badan ginjal dan selanjutnya menjadi segmen desenden. Lurus menembus medula dengan dangkal, dilanjutkan bagian nefron yang dinamakan lengkung henle. Tubulus kontortus proksimal dibatasi oleh sel epitel selapis kubis. Sel-sel ini mempunyai sitoplasma yang sangat asidofil sebagai akibat adanya banyak mitokondria yang memanjang. Pada hewan normal, tubulus kontortus proksimal mempunyai lumen dan lebar dan sel-sel gepeng dengan sitoplasma yang jelas. Tubulus satu dengan yang lain dipisahkan oleh ruang-ruang interstisial yang luas dan lumen menjadi lebar waktu tubulus mendekati medula.

4. Lengkung Henle

Masing-masing lengkung henle berbentuk huruf U dan mempunyai segmen tipis yang diikuti segmen tebal. Pada lengkung henle yang panjang, lengkung selalu terjadi pada

bagian yang tipis. Pada lengkung yang pendek, lengkung terdapat pada bagian yang tebal. Sebagian besar bagian tipis (desenden) berjalan turun dan sebagian besar bagian tebal (asenden) berjalan ke atas.

5. Tubulus kontortus distal

Tubulus kontortus distal merupakan segmen terakhir nefron. Tubulus distal dibatasi oleh epitel selapis kubis. Didasarkan pada sifat-sifat sel, sel tubulus proksimal lebih besar, mempunyai *brush border*, dan lebih asidofil karena banyak mengandung mitokondria. Sedangkan sel tubulus distal lebih pendek dan lebih kecil. Pada potongan yang sama, dinding tubulus distal terikat lebih banyak sel dan lebih banyak inti. Sel tubulus distal kurang asidofil dan mempunyai tonjolan-tonjolan lateral. Sebagian besar sel-sel ini mempunyai apparatus golgi pada daerah basalnya.

Perubahan-perubahan pada ginjal dapat terjadi di dalam glomeruli, tubuli, interstitium, dan pembuluh darah. Tubuli sering memperlihatkan tanda-tanda degenerasi, interstitium sering mengalami radang dan penambahan jaringan ikat. Pada dinding pembuluh darah sering terjadi perubahan-perubahan proliferasi. Perubahan-perubahan degenerasi pada tubuli terlihat misalnya denegnerasi berbutir-butir, degenerasi melemap, dan juga nekrosa. Pada penyakit-penyakit menular sering terjadi degenerasi parenkim tubuli, tetapi juga pada glomerulo nefritis subkronika atau kronika terlihat gejala degenerasi pada tubuli. Epitel membengkak dan mengakibatkan penyempitan lumen, sehingga lumen dapat berbentuk bintang karena penonjolan tidak teratur dari sel-sel ke dalam lumen. Tubuli ginjal mempunyai daya regenerasi yang besar. Sel-sel mati diganti oleh sel-sel baru yang terjadi karena pembagian intensif pada sel-sel yang masih hidup (Guyton dan Hall, 1997).

Fungsi Ginjal

Ginjal mempunyai banyak fungsi, diantaranya yaitu mengekskresi zat-zat penting melalui urin, misalnya urea dan kreatinin; pengaturan kebutuhan air dan elektrolit serta keseimbangan asam basa; pengaturan volume cairan ekstrasel dan tekanan darah arteri. Selain itu ginjal juga berperan dalam sintesis eritropoitin, dengan demikian mempengaruhi pembentukan eritrosit; serta hidrolaksi 25 hidroksi-kalsiferol menjadi 1,25 dihidroksikalsiferol, dengan demikian berperan pada metabolisme kalsium dan fosfat (Mutschler, 1991).

Histopatologi Ginjal

Pemeriksaan mikroskopis pada ginjal dapat dilihat dari adanya degenerasi sel, adanya pendarahan, dan nekrosis yang terjadi pada tubulus ginjal. Tubulus lebih mudah terkena toksin-toksin yang bersirkulasi dari kebanyakan jaringan-jaringan lain. Hal ini disebabkan karena 90% atau lebih dari aliran darah ginjal yang sangat besar didistribusikan ke korteks ginjal.

Nitrogen Urea Darah (BUN)

Determinasi urea digunakan secara luas untuk evaluasi fungsi ginjal. Tes ini seringkali digunakan bersama dengan determinasi kreatinin untuk diagnosis yang berbeda dari prerenal hiperuremia (dekompensasi jantung, depleksi air, peningkatan katabolisme protein), renal hiperuremia (glomerulonefritis, kronis nefritis, polisistik, nefrosklerosis, tubular nekrosis), dan postrenal hiperuremia (obstruksi saluran kencing).

Urea adalah hasil akhir dari degradasi protein dan metabolisme asam amino. Dalam katabolisme protein, protein dirusak menjadi asam amino dan amonia. Amonia pada proses ini disintesa menjadi urea di liver. Ini adalah jalur katabolik untuk ekskresi kelebihan nitrogen di tubuh manusia.

Kreatinin

Kreatinin disintesis secara endogen dari kreatin dan keratin fosfat. Dalam kondisi fungsi ginjal normal, kreatinin diekskresi oleh filtrasi glomerulus. Penentuan kreatinin dilakukan untuk diagnosis dan monitoring penyakit ginjal akut dan kronis. Konsentrasi kreatinin di urin bisa digunakan sebagai nilai referensi untuk ekskresi analit tertentu (albumin, α -amilase).

2.5 Tinjauan Hewan Coba Tikus

Tikus putih yang memiliki nama ilmiah *Rattus norvegicus* adalah hewan coba yang sering dipakai untuk penelitian. Hewan ini termasuk hewan nokturnal dan sosial. Salah satu faktor yang mendukung kelangsungan hidup tikus putih dengan baik ditinjau dari segi lingkungan adalah temperatur dan kelembaban. Temperatur yang baik untuk tikus putih yaitu 19°C – 23°C, sedangkan kelembaban 40 - 70% (Wolfensohn dan Lloyd 2013). Data taksonomi tikus yang sudah diketahui menurut Sugiyanto, 1995 sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodensia
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: Norvergicus

2.7 Tinjauan tentang LC-MS/MS

Teknik analisis yang dapat digunakan dalam *metabolite profiling*, antara lain adalah LC-MS, GC-MS, CE-MS, NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*), dan spektroskopi FT-IR (Lee *et al.*, 2012). Sejumlah teknik termasuk NMR

(*NuclearMagneticResonance*), LC (*Liquid Chromatography*) atau GC (*Gas Chromatography*) ditambah dengan MS (*Mass Spectrometry*) telah digunakan untuk *metabolit profiling*. Dibandingkan dengan NMR, LC-MS memiliki sensitivitas yang lebih tinggi, resolusi dan resolving power yang lebih baik dalam pemisahan puncak-puncak kandungan kimia, dan meningkatkan kesempatan untuk menemukan metabolit baru. Tidak seperti pada GC-MS, analisis dengan LC-MS lebih fleksibel. Hal ini berkaitan dengan rentang massa yang lebih luas dan memungkinkan untuk menargetkan beberapa golongan senyawa yang tidak terdeteksi oleh GC-MS. Selain itu, tidak diperlukan derivatisasi yang rumit, dan memungkinkan elusidasi struktur metabolit yang tidak dikenal dengan adanya analisis komposisi komponen dan penentuan massa yang akurat.

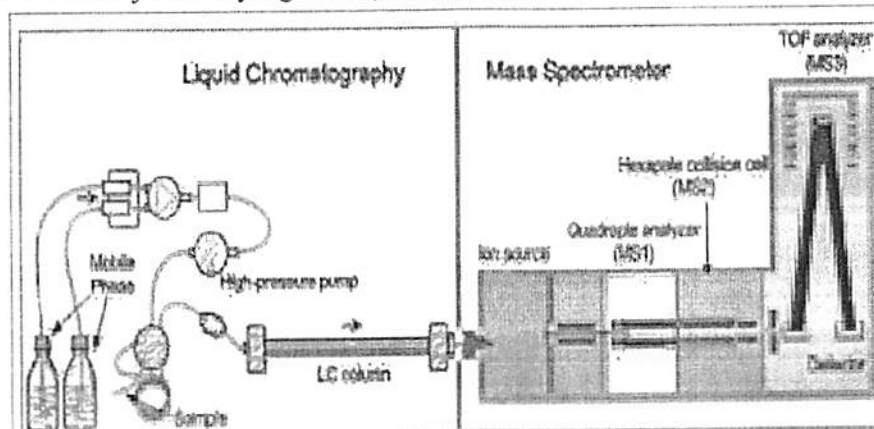
Diantara berbagai platform LC yang bervariasi, adanya pengembangan material partikel kolom menyebabkan munculnya teknologi pemisahan kromatografi baru, yaitu *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) yang memungkinkan pemisahan, resolusi dan sensitivitas yang baik, serta deteksi dengan kecepatan tinggi dengan sampel biologis yang kompleks, seperti obat tradisional. Dengan ditambah *Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry* (QTOFMS), UPLC-QTOFMS digunakan untuk memperoleh profil metabolit yang komprehensif dan *reliable* (Xie *et al.*, 2008). *Mass spectrometry* (MS) sering digabungkan dengan kromatografi dalam studi metabolomik untuk memberikan dimensi lain dari pemisahan sampel dan meningkatkan rasio *signal-to-noise*. Setelah sampel diinjek ke dalam instrumen, sampel akan mengalami pemisahan dalam LC. Selama pemisahan tersebut, sampel kemudian dipaksa oleh tekanan tinggi untuk menuju kolom yang dipacking dengan fase diam. Senyawa yang berbeda dalam larutan sampel terelusi dalam kolom pada waktu yang berbeda. Waktu tertentu dimana senyawa terelusi keluar dari kolom disebut waktu retensi. Waktu retensi senyawa ditentukan oleh kekuatan interaksi dengan fase diam, dan sering mengalami variasi yang besar tergantung pada kondisi penelitian. Karena hanya sejumlah kecil metabolit yang memiliki waktu retensi yang sama atau mirip, maka LC dapat mengurangi kompleksitas sampel dan *background noise* dalam deteksi MS (Zhou, 2011).

Setelah proses elusi dari LC, senyawa menuju ke dalam MS. Pada dasarnya, MS terdiri dari tiga bagian utama, yaitu *ion source*, *mass analyzer*, dan detektor. *Ion source* mengubah senyawa netral dalam sampel menjadi *molecular ions* yang bermuatan. Beberapa contoh *ion source* adalah *electrospray ionization* (ESI), *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI), *atmospheric pressure photoionization* (APPI), *fast atom bombardment* (FAB). ESI merupakan metode yang paling banyak digunakan karena dapat mengionisasi metabolit-metabolit dalam cakupan yang luas dengan berbagai berat molekul dan polaritas senyawa. Secara khusus, ESI merupakan pendekatan *soft ionization* yang umumnya membentuk *molecular ions* utuh, sehingga membantu identifikasi awal metabolit. Karena sifat kimia metabolit yang beragam, sering diperlukan analisis sampel biologis menggunakan mode ionisasi positif dan negatif untuk memaksimalkan cakupan *metabolome*.

Mass analyzer memisahkan ion-ion berdasarkan harga m/z -nya dengan menggunakan medan listrik atau magnet. Beberapa *mass analyzer* yang umum digunakan adalah *quadrupole*, *ion trap*, *time-of-flight* (TOF), Orbitrap and *Fourier transform ion cyclotron* (FT-ICR). Meskipun resolusi dan akurasinya berbeda secara signifikan, namun prinsip kerjanya sama. Selain itu, lebih dari satu *mass analyzer* sering digunakan dalam MS modern untuk melakukan penelitian *tandem mass spectrometry*, yang sangat diperlukan dalam identifikasi metabolit. Pada *tandem mass spectrometry* (MS/MS) dilakukan lebih dari satu tahap analisis MS, dengan fragmentasi molekul yang terjadi antara setiap tahap. Hal ini dapat dicapai melalui *multiple mass analyzers* yang terpisah atau *mass analyzer* tunggal yang dioperasikan dalam waktu yang berbeda. Beberapa contoh dari jenis instrumen ini adalah *quadrupole TOF* (QTOF), *triple-quadrupole* (QqQ), *quadrupole-ion trap*, Orbitrap, dan lain-lain. Pada bagian ini, prinsip tandem MS didemonstrasikan menggunakan instrumen LC-QTOF, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.12.

Detektor mengubah kelimpahan ion dari *mass analyzer* menjadi sinyal listrik melalui perekaman muatan yang diinduksi atau arus yang dihasilkan ketika sebuah ion melewati detektor. Misalnya, detektor *microchannel plate* (MCP) dikombinasikan dengan konverter *time-to-digital* (TDC) umumnya digunakan untuk TOF *analyzer*. Pada Gambar 2. 5 terdapat dua tahap dari *mass analyzer*, yaitu *quadrupole mass analyzer* (MS1) dan *mass analyzer TOF* (MS3). Antara kedua tahap tersebut terdapat *hexapole collision cell* (MS2). Bertentangan dengan penggunaan LC-MS dimana *quadrupole analyzer* bertindak sebagai *ion guide* yang memungkinkan semua ion lolos terlepas dari massanya, pada LC-MS/MS *quadrupole* bekerja

sebagai filter massa yang hanya mentransmisikan ion-ion dengan harga m/z tertentu. Quadrupole analyzer biasanya memfilter ion-ion dengan lebar massa 1-3 Da. Ion induk yang terpilih kemudian dipercepat hingga mencapai energi antara 20 sampai 200 eV dan ditransmisi melalui *hexapole collision cell*. Ion induk bertumbukan dengan molekul gas netral (biasanya argon atau nitrogen) yang terdapat dalam *collision cell*. Setelah beberapa tumbukan pertama, ion induk pecah menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil. Proses ini, disebut *Collision Induced Dissociation (CID)*, menghasilkan serangkaian ion produk dengan memecah ikatan kimia tertentu pada *molecular ions*. Pada kondisi penelitian yang sama, CID mengikuti jalur fragmentasi spesifik, sehingga menghasilkan ion produk yang relatif stabil. Ion-ion produk dipercepat dan masuk ke dalam *analyzer TOF* dan dipisahkan sesuai harga m/z -nya. Spektrum massa yang direkam oleh detektor memberikan informasi tentang ion produk dan ion induk. Spektrum MS/MS penting dalam identifikasi metabolit karena memberikan karakteristik sidik jari untuk metabolit yang berbeda bahkan jika metabolit ini memiliki *elemental formula* yang sama (Zhou, 2011).



Gambar 2.6 Diagram skematik dari instrumen LC-MS/MS (Zhou, 2011)

2.10 Principal Component Analysis (PCA)

Principal Component Analysis (PCA) merupakan salah satu teknik analisis multivariat yang sering digunakan dalam chemometric. PCA memungkinkan terjadinya ekstraksi dan menampilkan variasi sistematis dalam data. Model PCA menampilkan ringkasan atau gambaran dari semua pengamatan atau sampel dalam tabel data. Selain itu, pengelompokan (*grouping*), kecenderungan (*trend*), dan *outlier* juga dapat ditampilkan (Trygg *et al.*, 2007).

Prosedur PCA pada dasarnya bertujuan untuk menyederhanakan variabel yang diamati dengan cara mereduksi dimensinya. Hal ini dilakukan dengan cara menghilangkan korelasi

diantara variabel bebas melalui transformasi variabel bebas asal ke variabel baru yang tidak berkorelasi sama sekali atau yang biasa disebut dengan *principal component*. Setelah beberapa komponen hasil PCA yang bebas multikolinieritas diperoleh, maka komponen-komponen tersebut menjadi variabel bebas baru yang akan diregresikan atau dianalisis pengaruhnya terhadap variabel tak bebas dengan menggunakan analisis regresi (Subbash, 1996). Berikut ini adalah beberapa hal penting dari PCA, yaitu (Subbash, 1996) :

- Variabel-variabel baru disebut sebagai *principle component* dan nilai-nilai bentukan dari variabel ini disebut sebagai *principle component score*.
- Variabel yang baru merupakan kombinasi linier dari variabel-variabel asli.
- Variabel-variabel pertama berhubungan dengan *variance maximum* dari data.
- Variabel baru kedua menunjukkan *variance maximum* yang belum terhitung pada variabel pertama.
- Variabel baru ketiga menunjukkan *variance maximum* yang belum terhitung pada kedua variabel pertama

Hasil visualisasi PCA ditampilkan melalui *score plot* dan *loading plot*. *Score plot* menggambarkan kedekatan antar obyek (sampel). *Loading plot* menggambarkan tentang hubungan antarvariabel, yaitu variabel asli dan variabel baru (Esbensen, 2002). *Loading* memberikan indikasi variabel asli mana yang sangat penting atau mempengaruhi pembentukan variabel baru. Semakin tinggi nilai *loading* dari suatu variabel, maka variabel tersebut memiliki pengaruh dalam pembentukan *principle component score*, dan sebaliknya (Subbash, 1996).

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Umum

Mengetahui marker yang berpotensi toksik serta untuk mengetahui mekanisme toksisitas dari senyawa yang terbukti toksik.

3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui efek toksik ekstrak etanol 70% daun gandarusa terhadap histologi organ hati, ginjal, usus halus, paru, limfa dan jantung tikus.
2. Mengetahui profil metabolit plasma tikus yang mendapat ekstrak etanol 70% daun gandarusa.

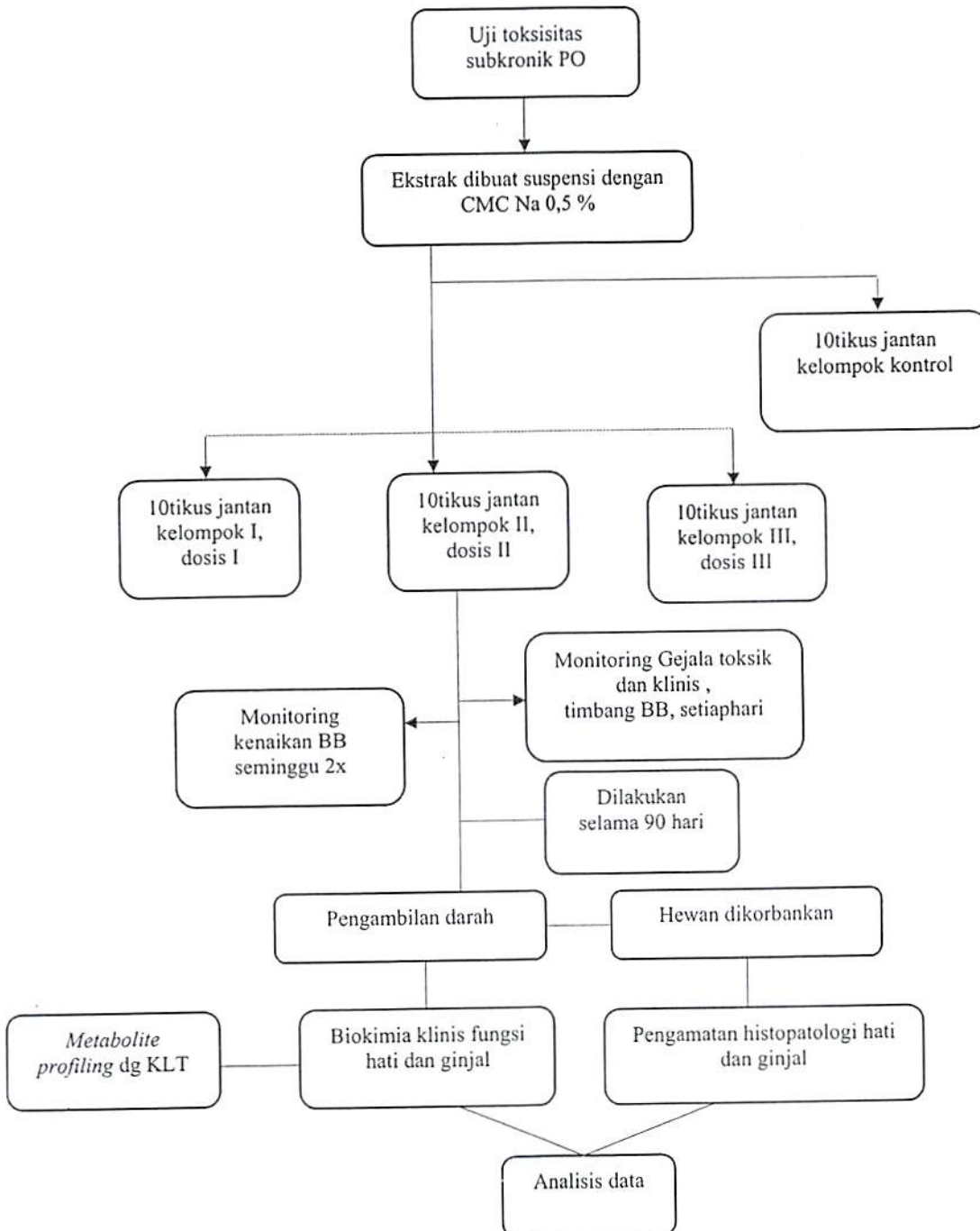
3.3 Manfaat

Sebagai data pendukung dari segi keamanan (*safety*) dari bahan sampel uji yang akan dilakukan uji klinik konfirmatory dalam waktu segera untuk memperoleh ijin edar dari BPOM.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian (*Research Design*)



Gambar 4.1 Skema kerja Uji Toksisitas

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

4.2 Bahan

Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol 70% daun gandarusa. Ekstrak ini diperoleh dari serangkaian proses semua bagian daun tanaman *Justicia gendarussa* Burm. f.

Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah Na sitrat, etanol 70%, CMC Na, aquadest, asetonitril, metanol.

Hewan Coba

Pada penelitian ini digunakan mencit jantan galur *Balb/C* sebagai hewan coba dengan berat antara 15-30 gram dan umur 6-8 minggu serta tikus jantan galur *Wistar* dengan berat antara 150-300 gram dan umur 6-8 minggu. Variasi berat badan tidak melebihi 20% dari rata-rata berat badan.

4.3 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik, timbangan hewan coba, kandang plastik dengan kawat penutup, sonde lambung, pinset, spuit injeksi, alat bedah, tabung bius, alat-alat gelas untuk analisis, mortar dan stamper, mikroskop, vortex, sentrifuge, dan KLT-Densitometri.

4.4 Prosedur Penelitian

Pembuatan Simplisia

Daun gandarusa yang telah berumur sembilan bulan dipanen. Dilakukan sortasi pada daun segar untuk memisahkan dari kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing seperti tanah, kerikil, rumput, bagian tanaman yang tidak diperlukan, dan lainnya. Setelah sortasi kemudian dicuci dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 50°C. Selanjutnya daun dijadikan simplisia dengan digiling.

Pembuatan Simplisia Bebas Alkaloid

Simplisia daun gandarusa diasamkan dengan larutan asam sitrat dengan kontrol pH 3. Pengasaman dilakukan selama 3x24 jam (dengan pengadukan) kemudian dilakukan pencucian dengan aquadest sampai pH netral. Simplisia kemudian dikeringkan pada suhu 50°C hingga susut pengeringan 10%.

Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Daun Gandarusa

Simplisia bebas alkaloid dimaserasi dengan etanol 70% selama 12 jam tanpa pemanasan. Maserasi ini diulang sampai tiga kali dan filtrat yang didapatkan dari tiap proses ditampung. Filtrat kemudian dipekatkan sampai diperoleh total solid $\geq 90\%$.

Penyiapan Hewan Coba

Mencit dan tikus jantan yang akan digunakan diadaptasikan dengan lingkungan selama 1 minggu. Semua mencit dan tikus dipelihara dengan cara yang sama dan mendapat diet yang sama pula. Sebelum dilakukan perlakuan, semua mencit dan tikus ditimbang untuk menghitung pengaturan dosis.

Mencit dan tikus dikelompokkan secara acak sedemikian rupa sehingga penyebaran berat badan merata untuk semua kelompok dengan variasi berat badan tidak melebihi 20% dari rata-rata berat badan. Berat badan mencit dan tikus diukur sebelum perlakuan, selama perlakuan, dan setelah perlakuan. Monitoring kenaikan berat badan dilakukan seminggu dua kali.

Penyiapan Bahan Uji

Pemberian tiap dosis dalam bentuk ekstrak yang disuspensikan dalam musilago CMC Na 0,5%. Kontrol negatif diberi musilago CMC Na 0,5%. Pembuatan musilago CMC Na 0,5% : Ditimbang 0,5 gram CMC Na, ditaburkan diatas air panas 20x nya, dibiarkan mengembang (± 15 menit), digerus sampai terbentuk musilago. Kemudian, dipindahkan ke dalam botol yang telah dikalibrasi dan ditambah air sampai 100 ml. Lalu, diberikan kepada kelompok kontrol secara oral.

Uji Toksisitas Subkronis

1. Dosis Uji Toksisitas Subkronis

Sekurang-kurangnya digunakan 3 kelompok dosis dan 1 kelompok kontrol. Dosis yang dipilih untuk uji toksisitas subkronis adalah berdasarkan data toksisitas akut dan pertimbangan dosis yang mempunyai efek farmakologi. Dosis bahan uji yang paling tinggi harus menimbulkan efek toksik tetapi tidak menimbulkan kematian atau gejala toksisitas berat, dosis menengah menimbulkan gejala toksik yang lebih ringan, sedangkan dosis yang paling rendah tidak menimbulkan gejala toksik (NOAEL).

2. Pemberian Sediaan Uji dan Volume Pemberian

Disiapkan 4 kelompok tikus yang masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor tikus. Untuk semua kelompok kecuali kelompok kontrol, tiap hewan coba diberi ekstrak gandarusa sesuai dengan dosis masing-masing.

Pemberian dilakukan secara per oral (dengan volume pemberian maksimal 1-2 mL sediaan uji/ 100g BB hewan), satu kali sehari atau minimal setiap 5 hari dalam seminggu selama 90 hari. Selama 90 hari, setiap hari diamati adanya gejala-gejala toksik dan gejala klinis. Sedangkan monitoring berat badan dilakukan seminggu dua kali. Hewan ditimbang setiap hari untuk menentukan volume sediaan uji yang akan diberikan.

Setelah perlakuan selama 90 hari, yaitu pada hari ke 91 masing-masing tikus diambil darahnya secara intrakardial. Kemudian diukur aktivitas enzim SGOT dan SGPT-nya serta BUN dan kreatinin dan pengujian profil darah lengkap. Selain itu juga dilakukan pengambilan hati, ginjal, usus halus, paru, limfa dan jantung dari tikus untuk dilakukan pengamatan mikroskopik. Dari aktivitas enzim SGOT, SGPT serta BUN dan kreatinin serta pengamatan mikroskopik pengambilan hati, ginjal, usus halus, paru, limfa dan jantung dapat dianalisa adanya kerusakan organ atau tidak.

- Kelompok kontrol : sebagai kelompok kontrol, diberi suspensi CMC Na 0,5%.
- Kelompok 1 : diberi ekstrak gandarusa dengan dosis 1/5 LD50 .
- Kelompok 2 : diberi ekstrak gandarusa dengan dosis 1/15 LD50.
- Kelompok 3 : diberi ekstrak gandarusa dengan dosis 1/25 LD50

3. Analisis Data Enzim SGOT, SGPT, BUN, dan Kreatinin

Data yang diperoleh dari aktivitas parameter biokimia tersebut dianalisis dengan ANAVA (*One Way*) pada derajat kepercayaan 95% untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan.

Hipotesa yang diajukan adalah sebagai berikut:

- Ho : Tidak ada perbedaan bermakna kadar parameter biokimia (SGOT atau SGPT atau BUN atau Kreatinin) antar kelompok perlakuan.
- Ha : Ada perbedaan bermakna kadar parameter biokimia (SGOT atau SGPT atau BUN atau Kreatinin) antar kelompok perlakuan.

Untuk menilai hipotesis statistik, dilihat harga Sig. Harga ini kemudian dibandingkan dengan $\alpha(0,05)$. Bila Sig. $< \alpha(0,05)$ maka Ho ditolak dan Ha diterima. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna, dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*). Dari hasil uji kemudian dilihat harga Sig. Harga ini kemudian dibandingkan dengan $\alpha(0,05)$. Bila Sig. $< \alpha(0,05)$ maka Ho ditolak dan Ha diterima.

4. Pengambilan Organ Hewan Coba

Untuk pengambilan organ hati, ginjal, usus halus, paru, limfa dan jantung, hewan coba dikorbankan secara “dislokasio tulang leher”.

Selanjutnya dilakukan pembedahan guna pengambilan organ-organ tersebut. Kemudian organ yang didapat difiksasi dengan larutan buffer formalin 10% untuk dibuat preparat histopatologik.

5. Pembuatan Preparat Histopatologi

Prosedur pembuatan preparat histopatologi (Martoprawiro, 1996; BPOM RI, 2014) dapat dilihat pada lampiran.

6. Pemeriksaan Preparat Histopatologi

Digunakan mikroskop cahaya untuk mengamati secara mikroskopik preparat organ tikus. Mula-mula digunakan perbesaran 100 kali kemudian digunakan perbesaran 400 kali. Setiap preparat organ tikus diamati perubahannya melalui lima lapang pandang yang berbeda. Pada setiap lapang pandang, diamati perubahan-perubahan yang terjadi (degenerasi dan nekrosis). Setiap preparat digeser lima kali lapang

pandang kemudian diskor, dijumlah dan dibagi lima (rerata), selanjutnya hasil dari lima kali pergeseran itu adalah data dari untuk satu preparat.

Penentuan perubahan histopatologi diamati berdasarkan batasan sebagai berikut:

- Degenerasi sel: terdapat perubahan pada sitoplasma sel berupa pembengkakan, akumulasi air, atau lemak
- Pendarahan: terdapat akumulasi eritrosit di luar pembuluh darah
- Nekrosis sel: terdapat perubahan pada inti sel berupa penggumpalan, reksis, atau lisis.

Adapun cara penilaian berupa penentuan skor (Sukardja, 1998) yaitu:

1. Nilai 0 : 0% kerusakan pada sel dalam satu lapang pandang.
 2. Nilai 1 : <25% kerusakan pada sel dalam satu lapang pandang.
 3. Nilai 2 : 25%-50% kerusakan pada sel dalam satu lapang pandang.
 4. Nilai 3 : 51%-75% kerusakan pada sel dalam satu lapang pandang.
 5. Nilai 4 : >75% kerusakan pada sel dalam satu lapang pandang.
7. Analisis Data Preparat Histopatologi

Data perubahan gambaran histopatologi organ tikus yang telah diberi skor, diolah dengan penilaian peringkat (rank) lalu dianalisis menggunakan uji statistik non parametrik dengan menggunakan Uji Kruskal Wallis karena data diperoleh berdasarkan nilai skoring atau penilaian derajat perubahan.

Hipotesa statistik:

- H_0 : tidak terdapat perbedaan bermakna di antara kelompok perlakuan akibat pemberian ekstrak gandarusa pada berbagai dosis.
- H_a : terdapat perbedaan bermakna di antara kelompok perlakuan akibat pemberian ekstrak gandarusa pada berbagai dosis.

Bila terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Perbandingan Berganda (Uji Z) 5% (Daniel, 1989). Profil Metabolit dengan KLT-Densitometri Analisis profil metabolit dilakukan pada plasma tikus yang merupakan subyek pada uji toksisitas subkronis.

Profil Metabolit dengan KLT-Densitometri

Analisis profil metabolit dilakukan pada plasma tikus yang merupakan subyek pada uji toksisitas subkronis.

1. Preparasi plasma dan ekstraksi sampel dari plasma

Untuk penyiapan plasma, darah diambil menggunakan spuit yang dilapisi heparin kemudian dipindah dalam tabung dan disentrifuge 3500 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan disimpan pada suhu -80°C sampai preparasi.

Untuk preparasi sampel, digunakan acuan metode dari Feng, *et al.*, 100 µL plasma dicampur dengan 400 µL metanol-asetonitril (4:1, v/v) dingin (4°C). Setelah divortex selama 30 detik dan disentrifuge (15.000 g, 4°C) selama 15 menit, supernatan dikeringkan. Residu dilarutkan dengan 100 µL asetonitril-air (2:98, v/v).

Sampel yang ditotolkan pada pelat KLT sebanyak 5µL.

2. Kondisi KLT-Densitometri

Digunakan pelat KLT silika gel dan eluasi dilakukan dengan 4 macam fase gerak yang mewakili polar, semi polar, dan non polar.

Non polar : Metanol : Kloroform (1:9)

Non polar : Toluena : Aseton (8:2)

Semi polar : Toluena : Kloroform : Aseton (8:5:7)

Polar : n Butanol : Asam asetat glasial : Air (5:1:4)

BAB 5. HASIL YANG DICAPAI

5.1 Uji Toksisitas Akut

Pemberian ekstrak etanol 70% daun *J. gendarussa* pada dosis 2000 mg/kg BB mencit ditemukan tidak menyebabkan kematian. Tidak ditemukan gejala toksik seperti bulu berdiri, mata kuning, perilaku tidak normal (tidak diam disatu tempat, tidak menggigiti bagian tubuh tertentu). Berikut pengamatan berat badan mencit pada uji toksisitas akut.

Tabel 5.1 Berat badan mencit pada uji toksisitas akut

Berat Badan Mencit (g)			
	Awal percobaan	Hari ke 7	Hari ke 24
Kelompok Kontrol	28±1	29±1	31±2
Kelompok Uji dosis (2000mg/kg BB)	28±1	31±1	32±1

Disimpulkan bahwa menurut *Organisation for Economic Co-operation Development (OECD)* tahun 2001 ekstrak etanol 70% daun *J. gendarussa* masuk kategori 5 yaitu LD₅₀ diatas 2000 mg/kg BB mencit dan dosis tersebut merupakan dosis NOAEL (No Observed Adverse Effect Level).

5.2 Uji Toksisitas Subkronis

5.2.1 Monitoring Gejala Klinik dan Berat Badan

Pada uji toksisitas subkronik 90 hari ekstrak etanol 70% daun *J. gendarussa* pada tikus tidak ditemukan kematian pada hewan coba, pengamatan tingkah laku dan tanda-tanda toksisitas klinik ekstrak etanol 70% daun *J. gendarussa* tidak menyebabkan perubahan tingkah laku seperti berjalan mundur, menggigiti bagian tubuh tertentu, mata menguning, dan bulu berdiri.



Tabel 5.2 Berat badan tikus pada uji toksisitas akut

Berat Badan Tikus (g)				
	Kontrol	Dosis I	Dosis II	Dosis III
Awal Percobaan	147±6	149±6	145±4	144±4
Akhir Percobaan	296±26	258±43	265±15	257±26

5.2.2 Pemeriksaan Fungsi Hati dan Ginjal

Untuk mengetahui efek hepatotoksik etanol 70% daun *J. gendarussa*, dilakukan pemeriksaan enzim SGOT dan SGPT pada tikus. Sedangkan untuk mengetahui efek nefrotoksik, dilakukan dengan pemeriksaan BUN dan kreatinin.

Data yang diperoleh dari aktivitas parameter biokimia dianalisis dengan One-Way ANOVA (menggunakan SPSS ver 24) pada derajat kepercayaan 95% untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Sebelumnya dilakukan uji distribusi dengan Uji Shapiro-Wilk. Jika data berdistribusi normal maka dilakukan uji statistik parametrik One-Way ANOVA. Bila hasil uji One-Way ANOVA ada perbedaan antar kelompok perlakuan (ditunjukkan dengan nilai p kurang dari 0,05) dilanjutkan dengan uji Post Hoc. Uji Post Hoc yang dipilih berdasarkan nilai p pada uji homogenitas. Apabila pada uji homogenitas nilai p lebih dari 0,05 maka dipilih uji Post Hoc Bonferroni, dan bila p kurang dari 0,05 maka dipilih Post Hoc Games-Howell. Sedangkan, apabila data berdistribusi tidak normal maka dilakukan uji non parametrik Uji Kruskal Wallis dan dapat dilanjutkan uji Post Hoc dengan U Mann-Whitney jika terdapat perbedaan.

Tabel 5.3 Hasil olah data statistik biokimia darah tikus dengan SPSS

Parameter	Perbedaan Antar Kelompok (p)	Perbedaan Antara Kelompok (p)		
		1 & 2	1 & 3	1 & 4
SGOT	0,170	-	-	-
SGPT	0,039	0,330	0,012	0,232
BUN	0,000	0,002	0,083	0,000
Kreatinin	0,176	-	-	-

Dari tabel tersebut diketahui harga p SGOT (0,170) lebih besar dari 0,05 yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan. Sedangkan untuk SGPT diketahui harga sig (0,039) lebih kecil dari 0,05 yang

menunjukkan bahwa ada beda antar kelompok perlakuan. Dimana pada uji post hoc didapatkan bahwa kelompok dosis 200 mg/kgBB berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol.

Untuk parameter fungsi ginjal diketahui dari tabel tersebut harga sig BUN (0,000) lebih kecil dari 0,05 yang menunjukkan bahwa ada beda antar kelompok perlakuan. Dimana pada uji post hoc didapatkan bahwa kelompok dosis 200 mg/kgBB berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sedangkan untuk kreatinin, dari tabel tersebut diketahui harga p (0,176) lebih besar dari 0,05 yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan.

5.2.3 Hasil Pemeriksaan Hematologi

Berikut hasil pemeriksaan hematologi tikus berdasarkan 5 parameter, yaitu hemoglobin, leukosit, trombosit, eritrosit, hematokrit.

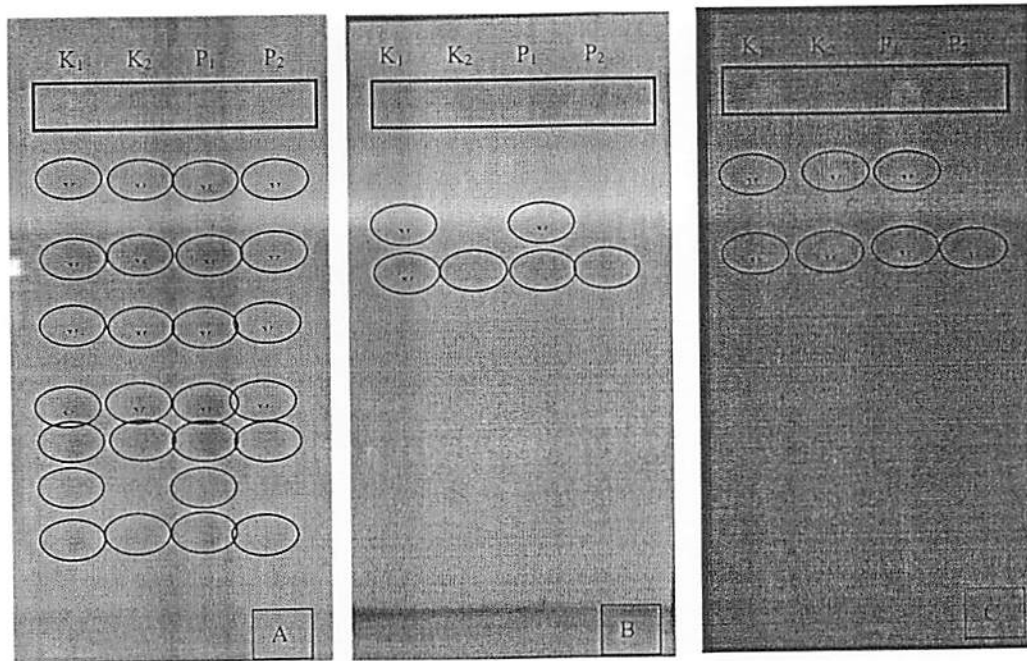
Tabel 5.4 Hasil olah data statistik hematologi tikus dengan SPSS

Parameter	Perbedaan Antar Kelompok (p)	Perbedaan Antara Kelompok (p)		
		1 & 2	1 & 3	1 & 4
Hemoglobin	0,444	-	-	-
Leukosit	0,004	1,000	0,044	1,000
Trombosit	0,080	-	-	-
Eritrosit	0,601	-	-	-
Hematokrit	0,033	0,295	0,121	0,039

Dari tabel diketahui, dari kelima parameter yang dihitung, leukosit dan hematokrit dimana nilai p lebih kecil dari 0,05 menunjukkan perbedaan antar kelompok perlakuan. Untuk leukosit, kelompok 3 (dosis 2) mempunyai nilai p lebih kecil dari 0,05 (p 0,044) artinya dosis ini mempunyai perbedaan dibandingkan dengan kelompok 1 (kontrol). Sedangkan untuk hematokrit, kelompok 4 (dosis 3) mempunyai nilai p lebih kecil dari 0,05 (p 0,039) yang artinya dosis ini mempunyai perbedaan dibandingkan kontrol.

5.2.3 Pengamatan Profil Kromatogram Organ Tikus dengan Metode KLT dan LCMS

Pengamatan dilakukan dengan cara organ tikus diekstrak hingga didapatkan ekstrak cair kemudian ekstrak yang dilakukan analisa dengan metode Kromatografi Lapis Tipis untuk mengetahui apakah ada senyawa atau metabolit yang terdeposit dalam organ. Setelah didapatkan profil kromatogram dengan metode KLT, dilakukan analisis dengan LCMS.



Gambar 4.2 Profil Kromatogram Ekstrak Ginjal

Keterangan :

A : Setelah disemprot penampak bercak Ninhidrin

B : UV 254

C : UV 366

K₁ : Sampel kontrol 100 μ L

K₂ : Sampel kontrol 200 μ L

P₁ : Sampel perlakuan 100 μ L

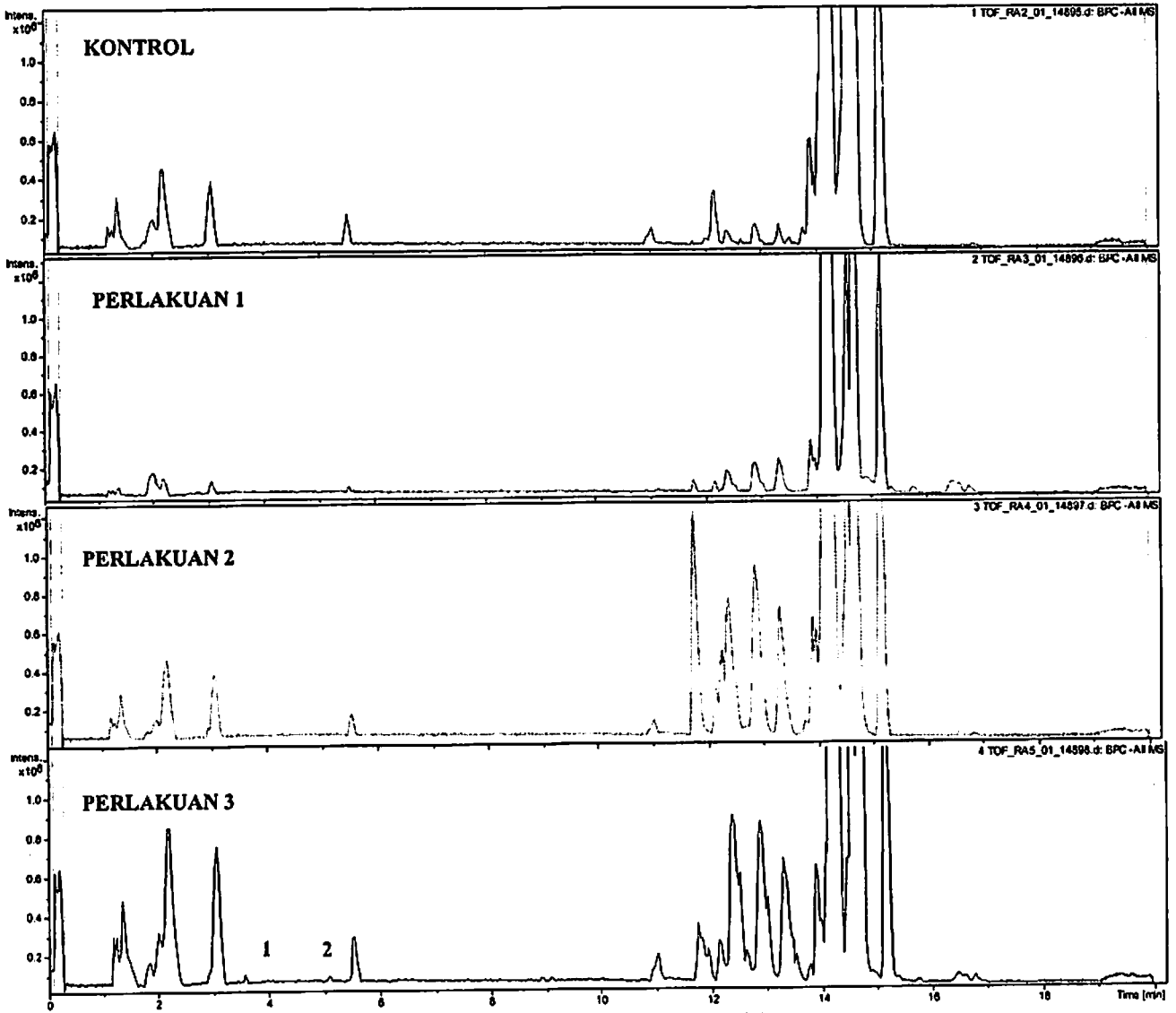
P₂ : Sampel perlakuan 200 μ L

Tabel 5.5 Hasil *R_f* Profil Kromatogram Ekstrak Ginjal Tikus

Kisaran <i>R_f</i>	Kontrol 100 µL			Kontrol 200 µL			Perlakuan 100 µL			Perlakuan 200 µL		
	Sebelum disemprot Ninhidrin		Sesudah disemprot Ninhidrin	Sebelum disemprot Ninhidrin		Sesudah disemprot Ninhidrin	Sebelum disemprot Ninhidrin		Sesudah disemprot Ninhidrin	Sebelum disemprot Ninhidrin	disemprot	Setelah disemprot Ninhidrin
	UV 254	UV 366	Visual	UV 254	UV 366	Visual	UV 254	UV 366	Visual	UV 254	UV 366	Visual
0,00-0,10												
0,11-0,20			0,12 (k) ¹			0,12 (k) ¹			0,12 (k) ¹			0,12 (k) ¹
0,21-0,30			0,22 (j) ²			0,3 (j) ²			0,22 (j) ²			0,3 (j) ²
			0,3 (k) ³						0,3 (k) ³			
0,31-0,40			0,36 (j) ⁴			0,35 (j) ²			0,36 (j) ⁴			0,35 (j) ²
0,41-0,50			0,5 (v) ⁵			0,5 (v) ⁴			0,5 (v) ⁵			0,5 (v) ⁴
0,51-0,60												
0,61-0,70	0,67 (k) ¹	0,65 (b) ¹	0,68 (u) ⁶	0,67 (k) ¹	0,65 (b) ¹	0,66 (u) ⁵	0,67 (k) ¹	0,65 (b) ¹	0,68 (u) ⁶	0,67 (k) ¹	0,65 (b) ¹	0,66 (u) ⁵
0,71-0,80	0,73 (k) ²				0,74 (b) ²	0,79 (u) ⁶	0,74 (k) ²	0,81 (b) ²				0,78 (u) ⁶
0,81-0,90		0,81 (b) ²	0,8 (u) ⁷						0,8	0,73 (k) ²		
0,91-1,00	0,96 (k) ³	0,96 (b) ³	0,96 (u) ⁸	0,96 (k) ²	0,96 (b) ³	0,96 (u) ⁷	0,96 (k) ³	0,96 (b) ³	0,96	0,96 (k) ³	0,96 (b) ²	0,96 (u) ⁷

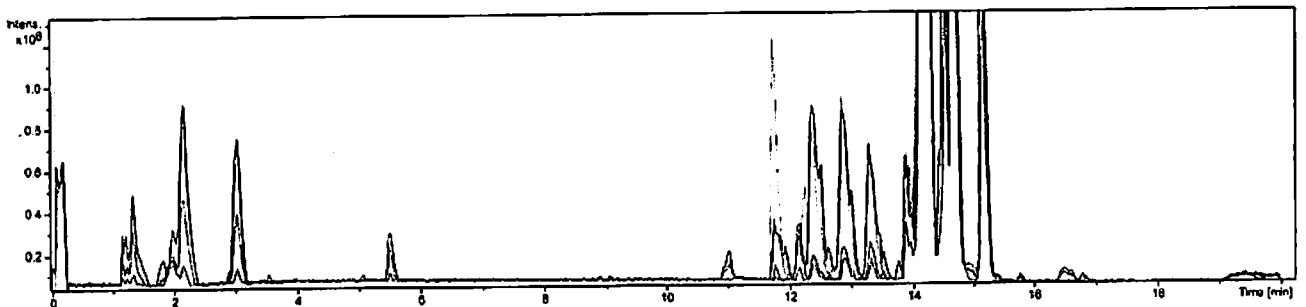
Keterangan : k (kuning); j (jingga); m (merah); u (ungu); b (biru)

HASIL ANALISA PROFIL LCMS

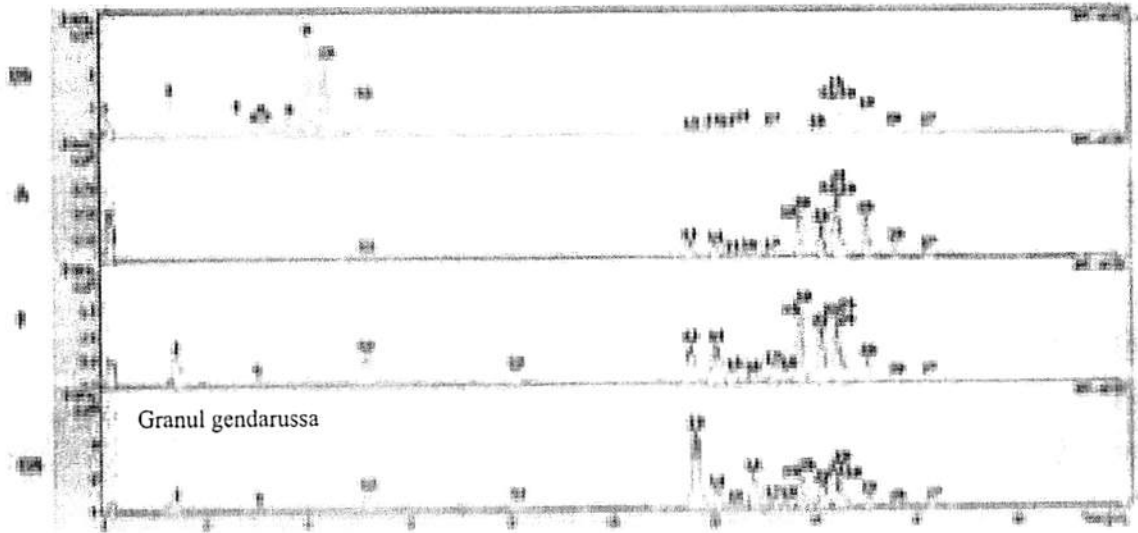


Gambar 4.3 Hasil analisa LCMS organ ginjal

OVERLAID ALL SAMPLES

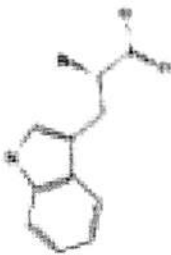


Gambar 4.4 Hasil overlay LCMS organ ginjal



Gambar 4.5 Hasil LCMS ekstrak dan granul gendrusa

Compound No.1

Time	Retention Time	Mass	Structure	Formula	Category
10.2	10.2	214.0718		$C_{11}H_{12}N_2O_2$	Biogenic
10.2	10.2	214.0718		$C_{11}H_{12}N_2O_2$	Derivat

Compound No.2

Time	Retention Time	Mass	Structure	Formula	Category
10.2	10.2	214.0718		$C_{11}H_{12}N_2O_3$	Biogenic
10.2	10.2	214.0718		$C_{11}H_{12}N_2O_3$	Derivat

RT 1-10		
M-H	203.0825	174.056
RT	3.57	5.1
m/z calc.	203.0826	174.0561
Err [mDa]	0.1	0.1
Err [ppm]	0.3	0.4
FORMUL A	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂	C ₁₀ H ₈ NO ₂
Sampel	KG (-)/PG2 (-)/PG3 (+)	KG (-)/PG2 (-)/PG3 (+)
Fragmen	59.014	59.0139 69930
	72.009	116.0506 2798
	74.0248	130.0662 6766
	85.0659	
	93.0346	
	116.0507	
	142.0663	
	159.0927	
	164.0719	
	186.0553	

5.2.4 Pengamatan Histopatologi Hati dan Ginjal

Pengamatan perubahan histopatologi dilakukan dengan menggunakan scoring yang mengacu pada Arsad et al., 2014. Pengambilan data dilakukan pada pembesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya biasa merk Nikon H600L yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel.

HASIL PEMERIKSAAN HISTOPATOLOGI & IMMUNOHISTOKIMIA

Nama Pemilik : Prof Bambang
 Instansi :
 Alamat :
 Telepon :
 Sediaan : Hepar dan Ginjal
 Pewarnaan : HE
 Waku Pemeriksaan :
 Pemeriksa : Djoko Legowo, MKes., drh

Metode Pemeriksaan

Pemeriksaan ini dimaksudkan untuk perubahan histopatologi pada organ. Pengamatan perubahan histopatologi dilakukan dengan menggunakan *scoring* yang mengacu pada Arsad *et al.*, 2014.

Pengambilan data dilakukan pada pembesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon H600L* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel.

Pengamatan organ dilakukan dengan mengamati derajat perubahan pada organ dengan score sebagai berikut:

- 0 = Tidak terdapat perubahan
- 1 = Perubahan ringan
- 2 = Perubahan sedang
- 3 = Perubahan berat

Adapun persentase perubahan yaitu:

- 0 = 0%
- 1 = <30%
- 2 = 30-50%
- 3 = >50%

Surabaya,
 Pemeriksa,

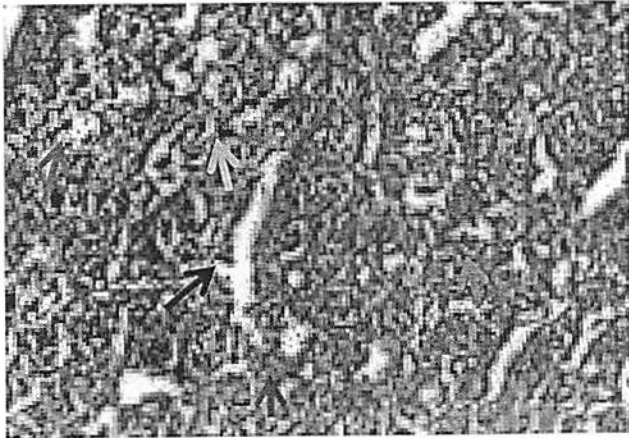
(Djoko Legowo, Mkes., drh)
 NIP. 196712141996031001

Referensi :

Arsad, S. S, N. M. Esa, and H. Hamzah. 2014. Histopathologic Changes in Liver and Kidney Tissues from Male Sprague Dawley Rats Treated with *Rhaphidophora Decursiva* (Roxb.) Schott Extract. *J. Cytol. Histo.*

Organ	Perubahan yang Diamati (rata-rata) dari masing-masing kelompok	Kelompok			
		K-	P1	P2	P3
Hepar	Sel Kupffer yang teraktivasi	0,6	0,78	1,02	1,5
	Dilatasi Sinusoid	0,4	0,52	0,87	1,76
	Vakuola Sitoplasma	1,2	1,0	2,54	2,84
	Karyolisis	1,1	1,02	2,2	2,24
	Karyopiknotis	1,0	0,96	1,74	1,86
	Rata-rata	0,86	0,856	1,674	2,04
Ginjal	Granular Cast	0,1	0,08	1,06	1,16
	Celluler Cast	0,1	0,1	1	1,16
	Protein Cast	0,2	0,18	0,88	0,5
	Piknotis Sel	0,6	0,62	0,9	1,26
	Degenerasi Hidropik	0,4	0,4	1,6	1,72
	Rata-rata	0,28	0,276	1,088	1,16

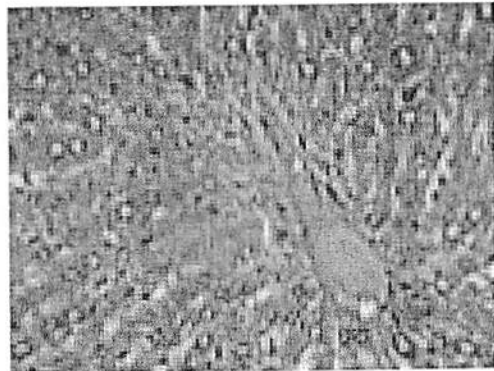
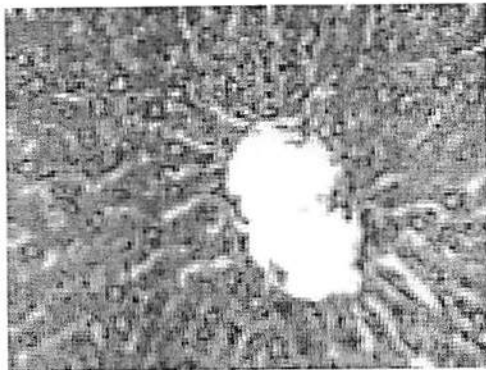
Hepar

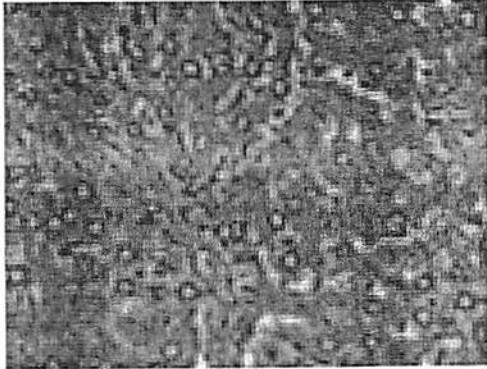
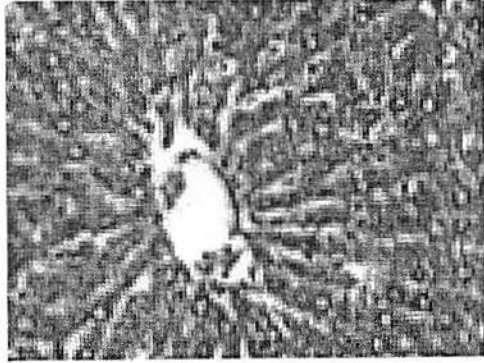
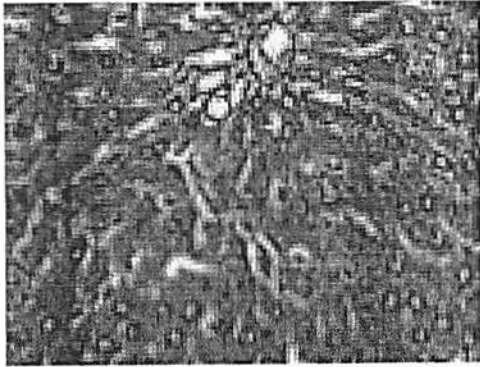


Gambar 1: Parameter perubahan histopatologi hepar. a. Sel kupffer yang teraktivasi (panah kuning) b. Dilatasi sinusoid (panah hitam) c. Vakuola sitoplasma (panah biru) d. Karyolisis (panah merah) e. Karyorhexis (panah hijau).

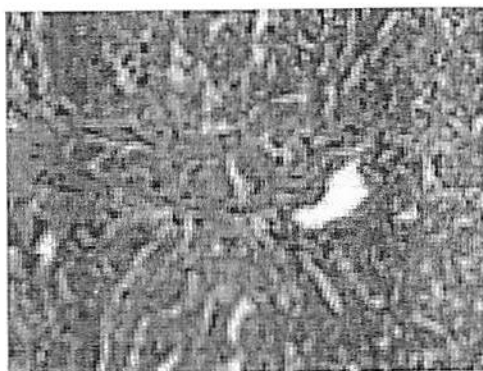
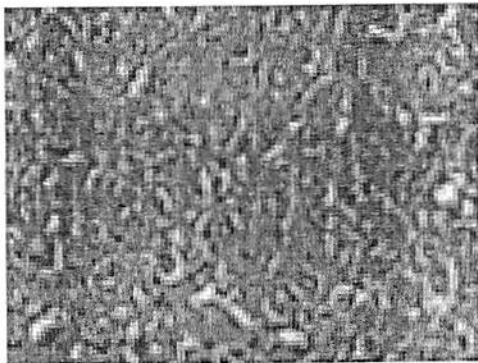
Hepar:

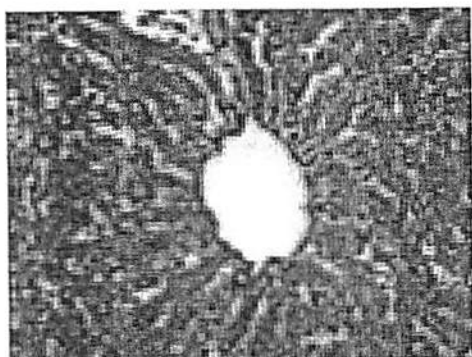
K 1



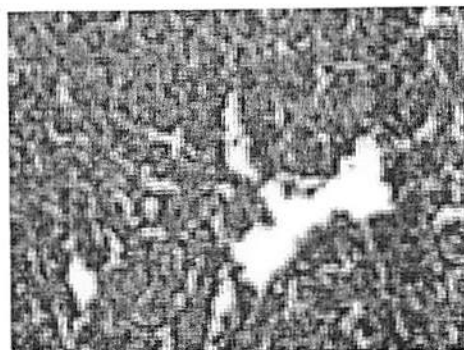
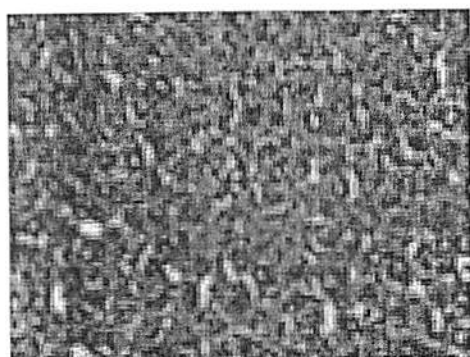
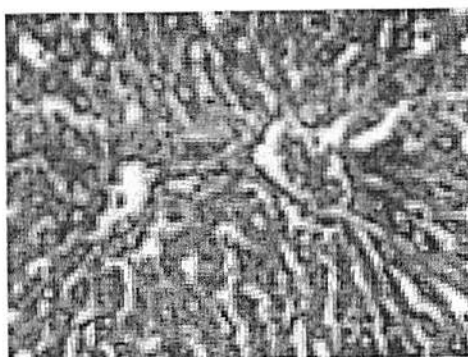
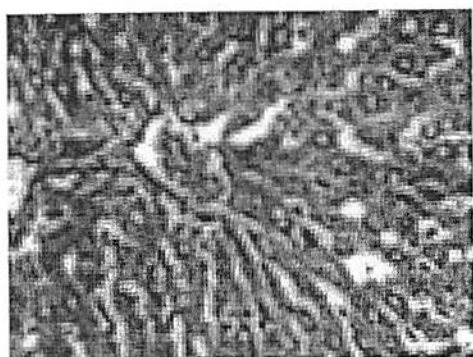


K 2

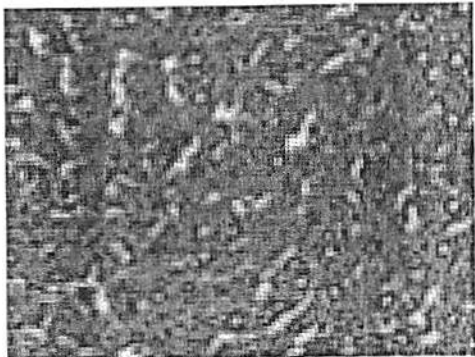
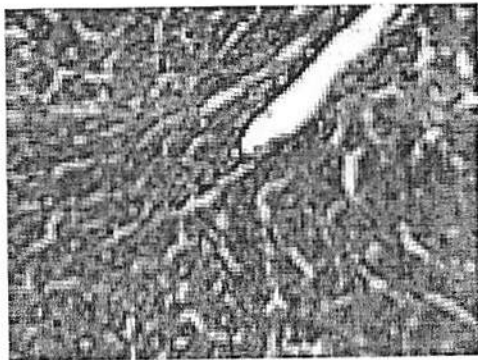
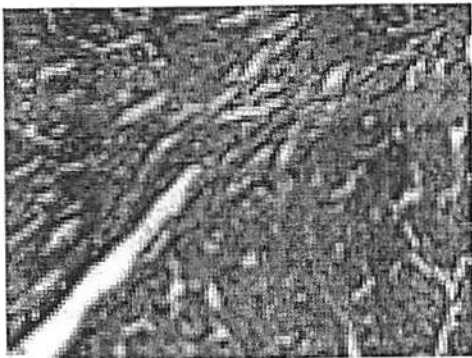
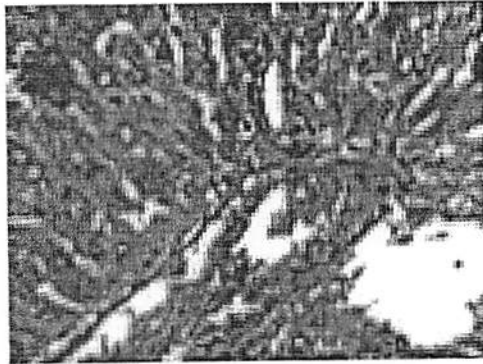
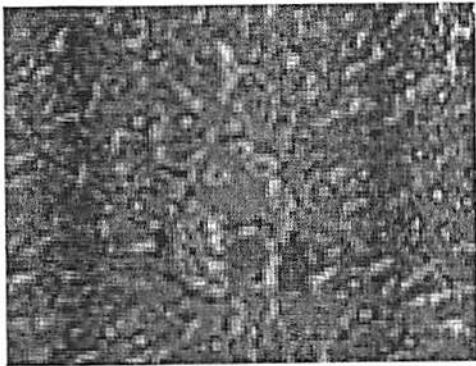




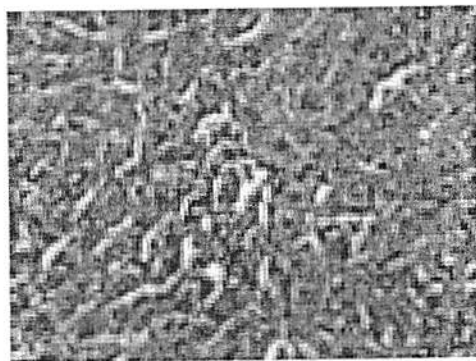
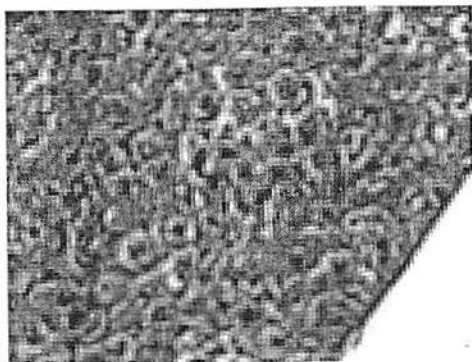
K 3

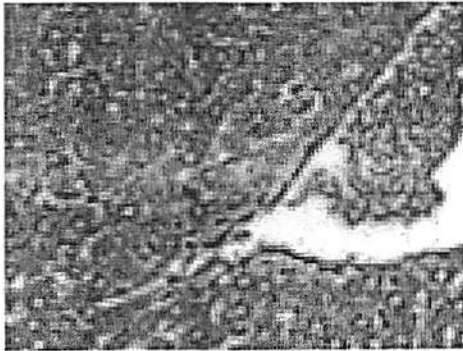
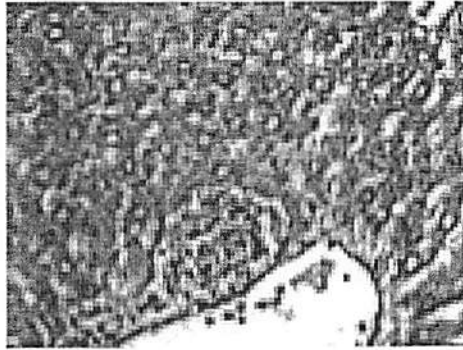
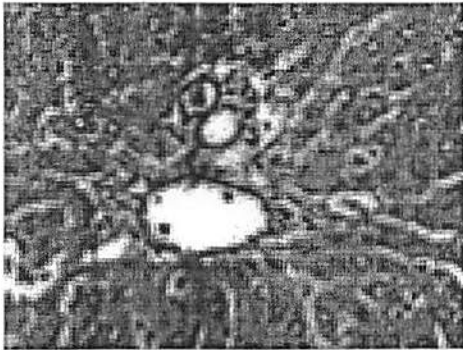


K 4

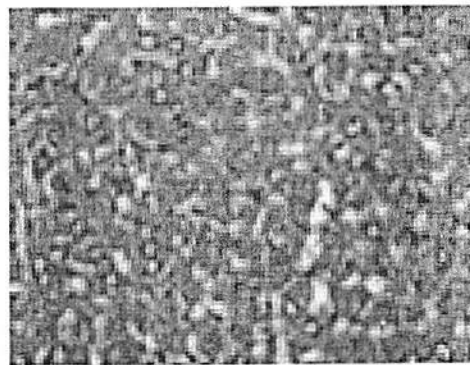
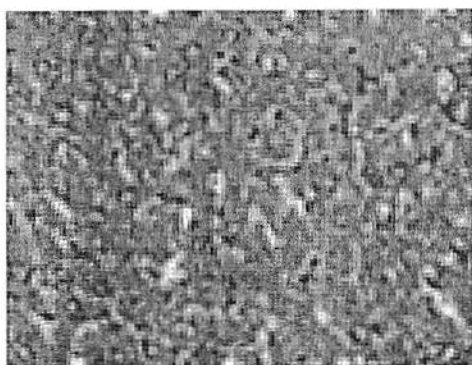
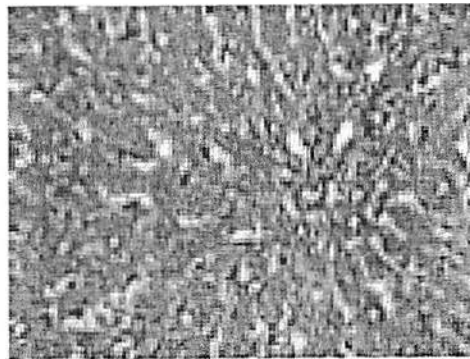
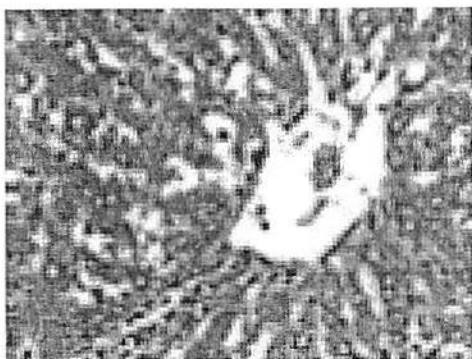


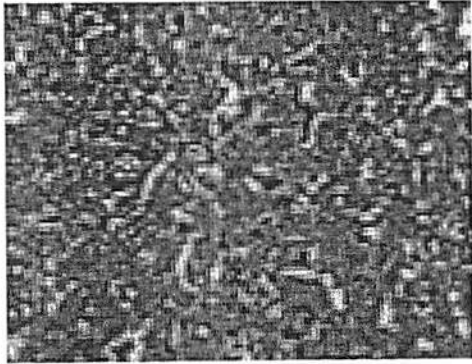
K 5



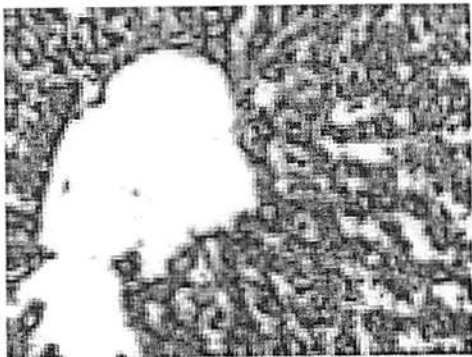
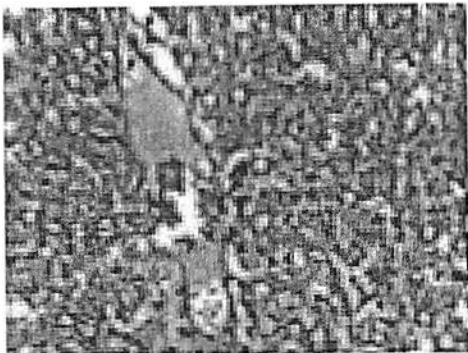
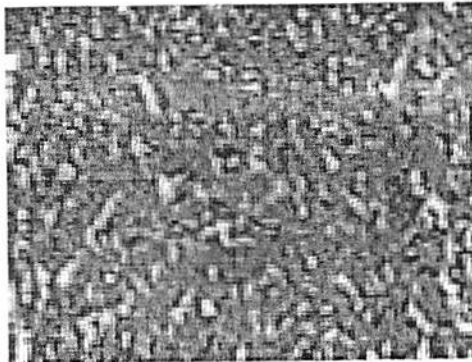
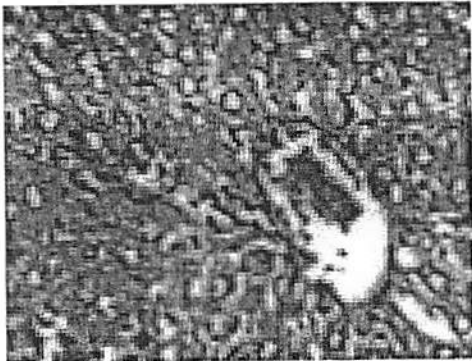


K 6

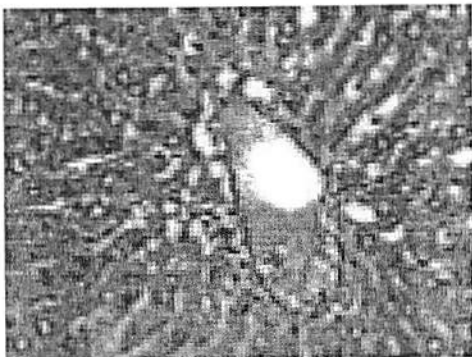
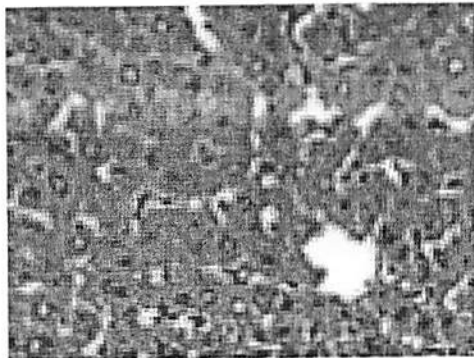
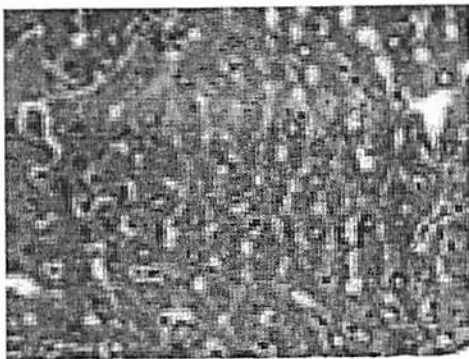
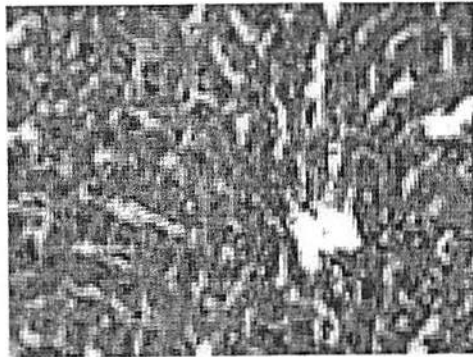
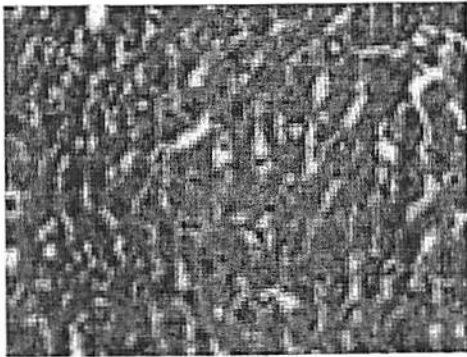




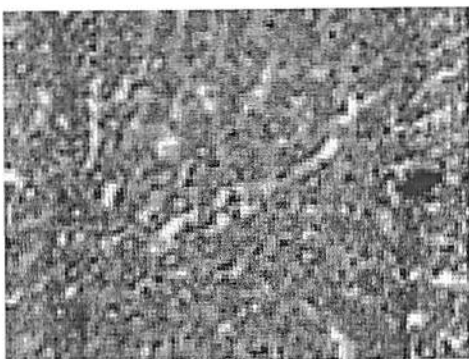
K 7

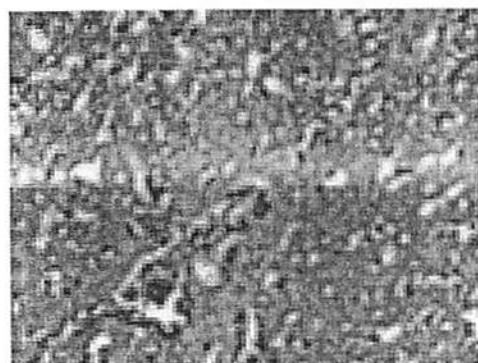


K 8

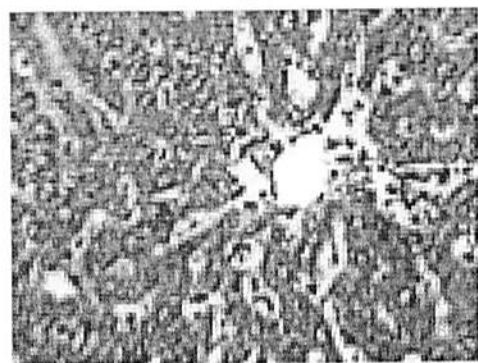
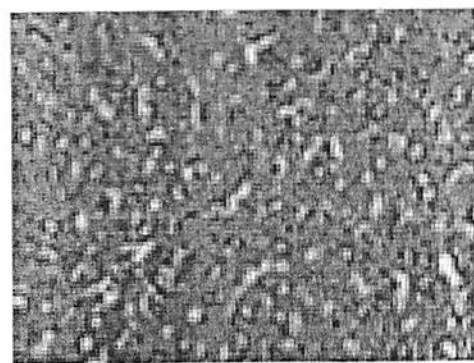
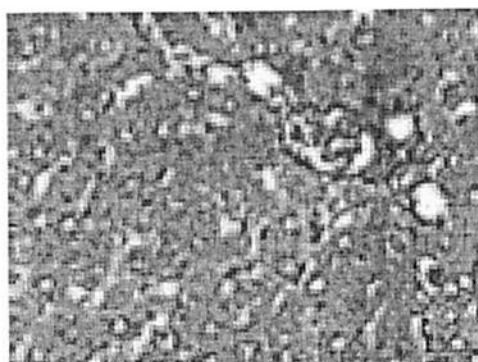


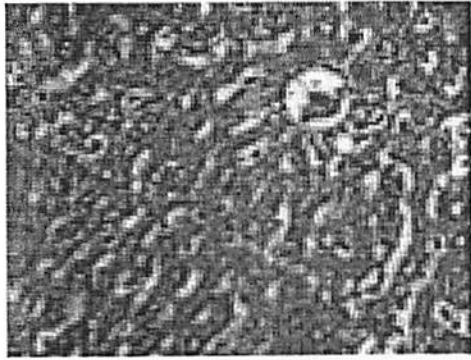
K 9



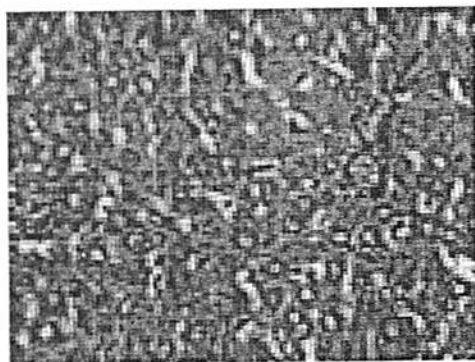
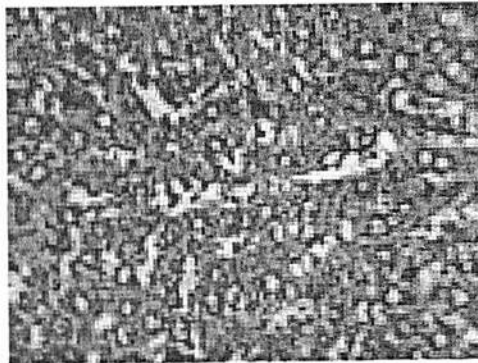
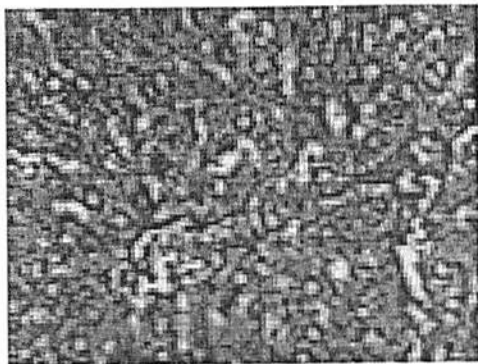
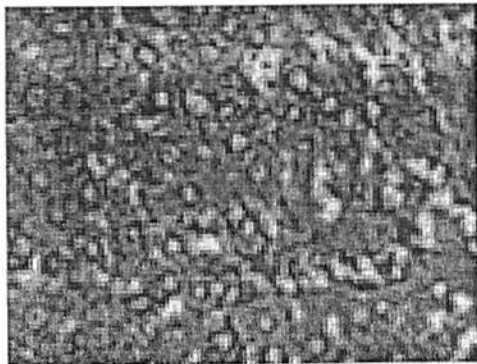


K 10

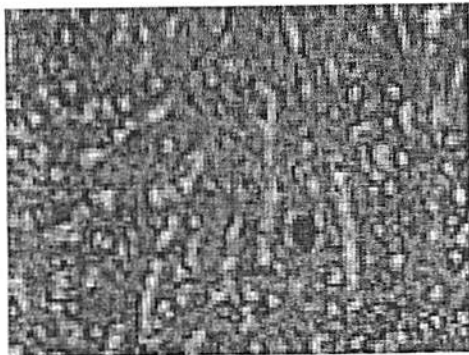
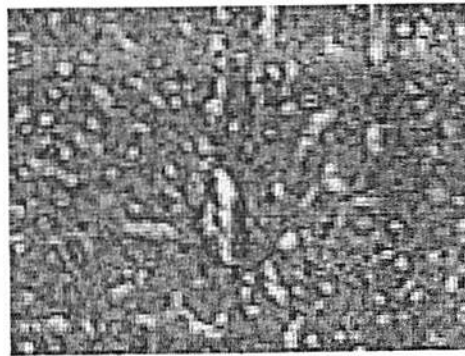
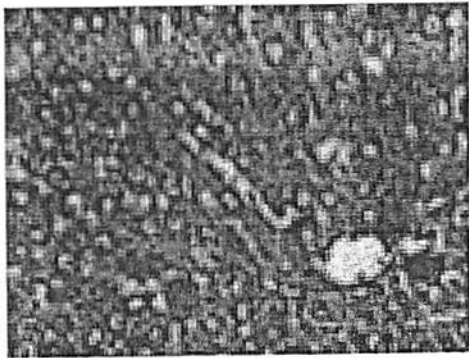
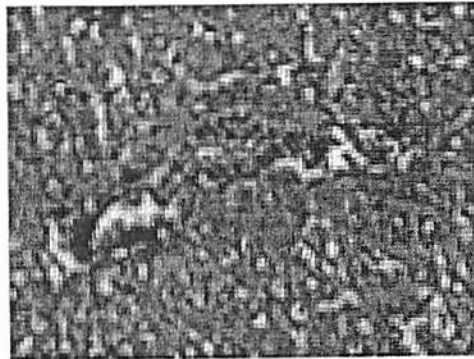
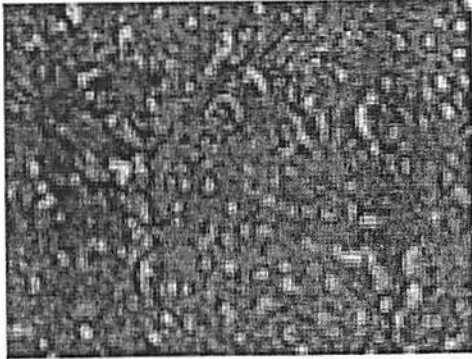




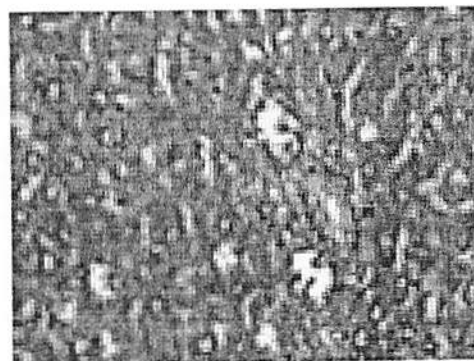
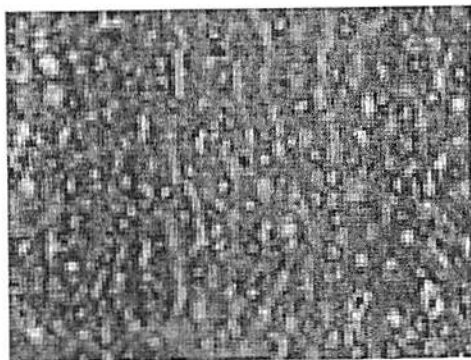
P 1-1

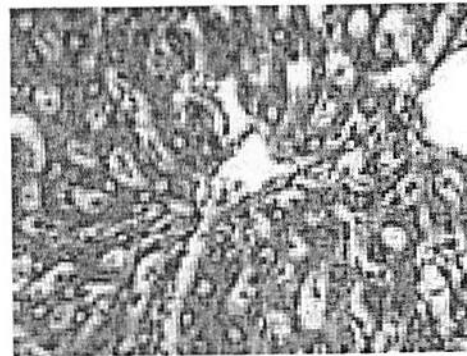
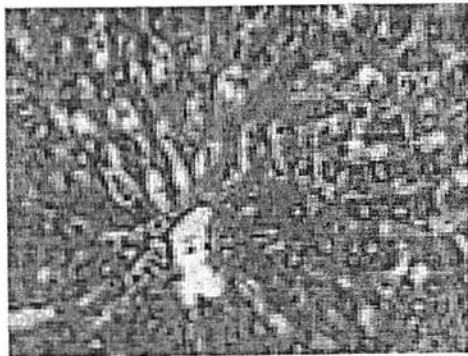
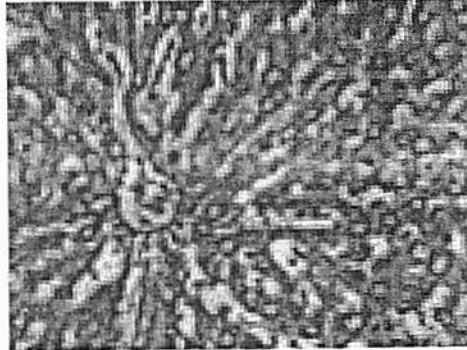
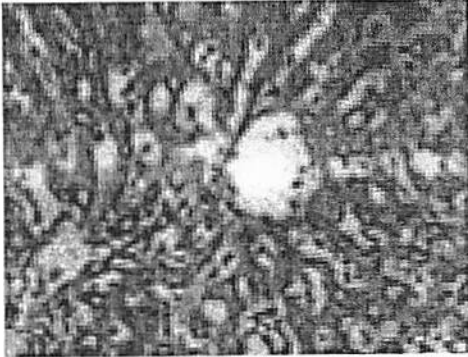
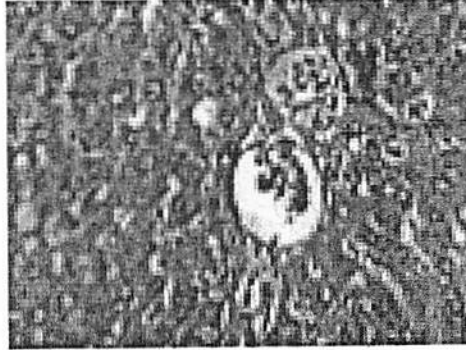
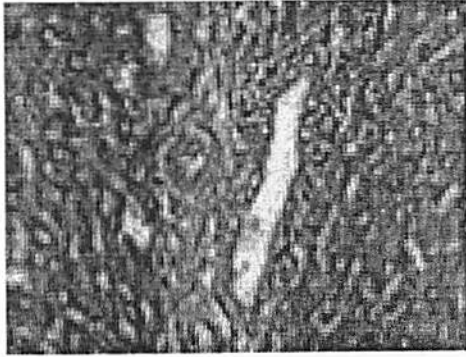


P 1-2

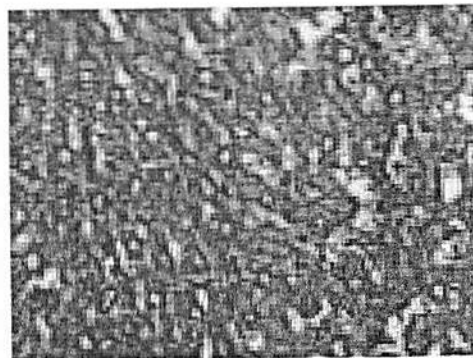
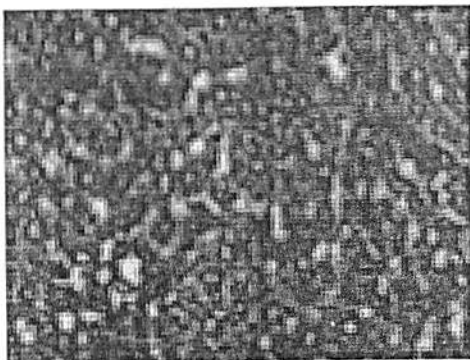


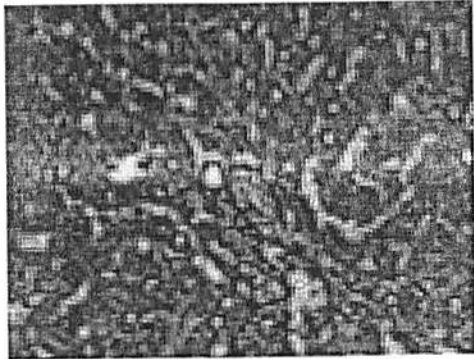
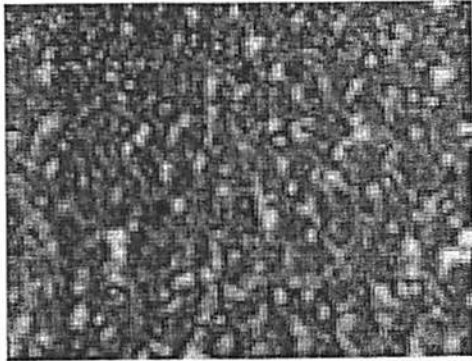
P 1-3



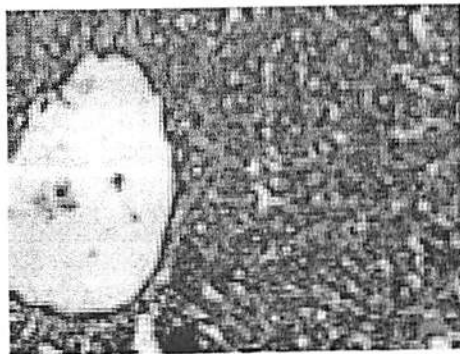
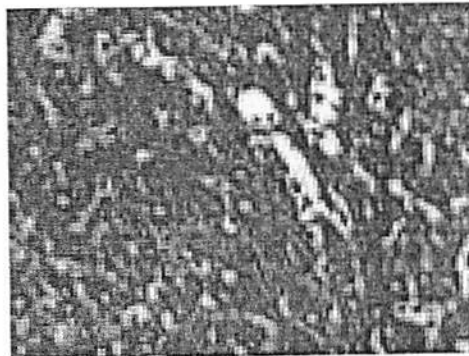
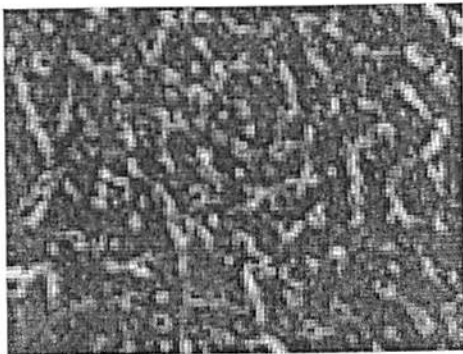


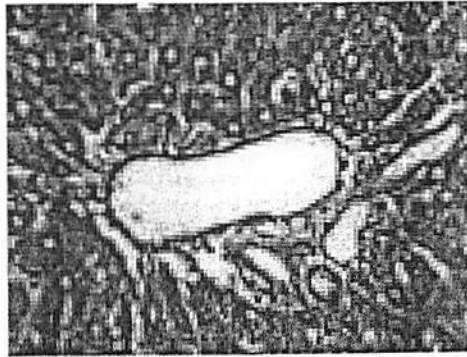
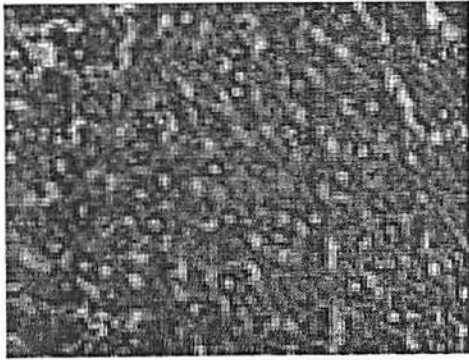
P 1-4



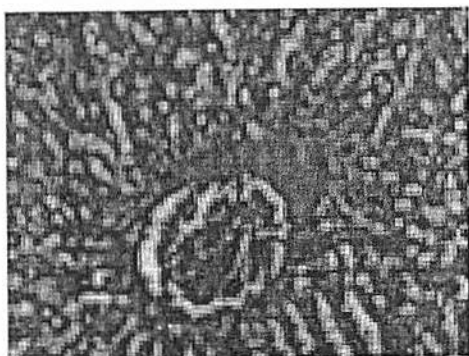
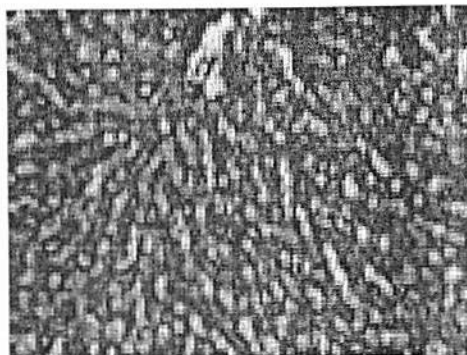
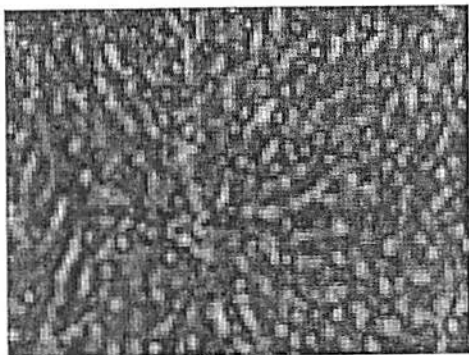
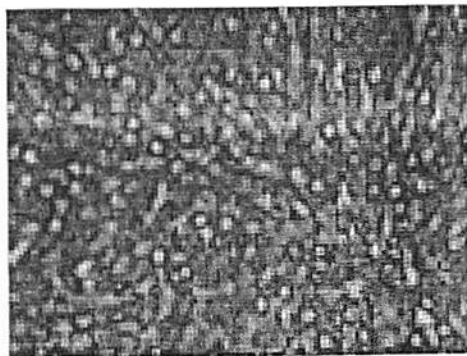
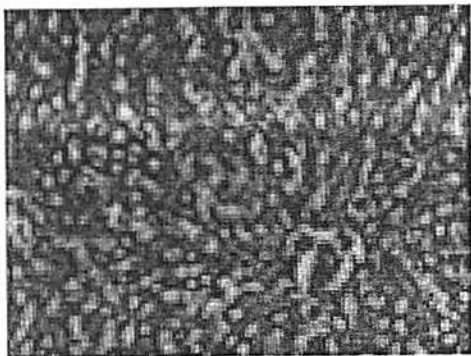


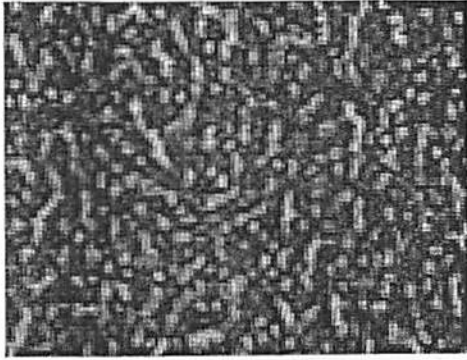
P 1-5



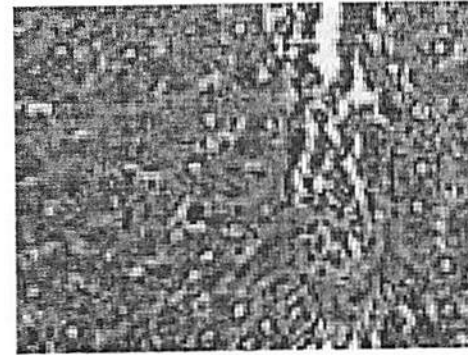
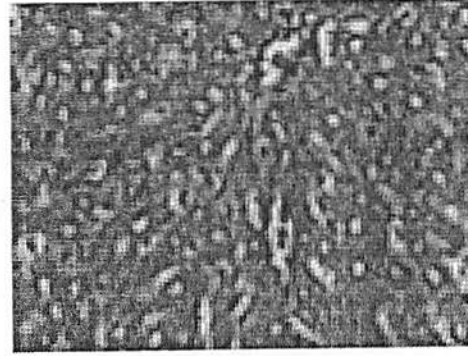
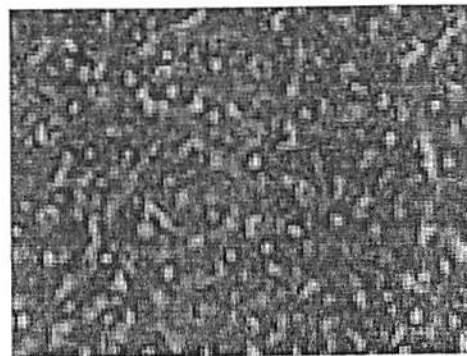
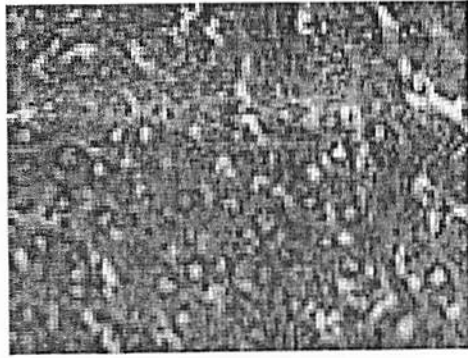
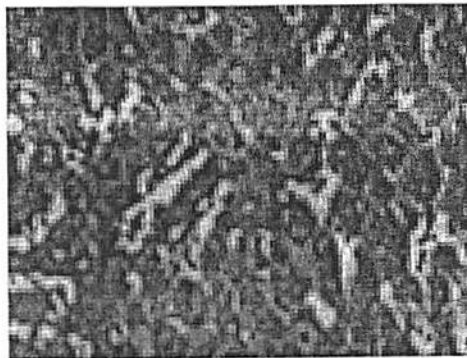


P 1-6

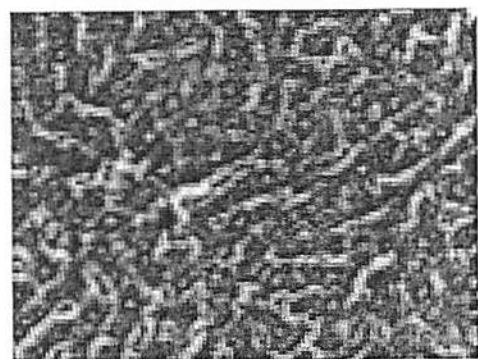
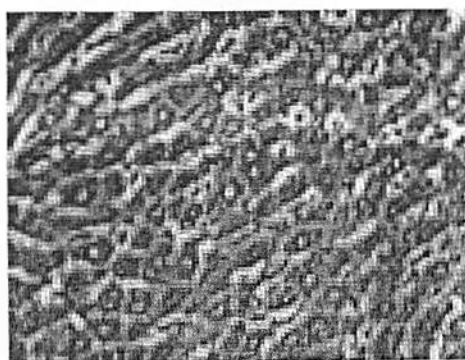
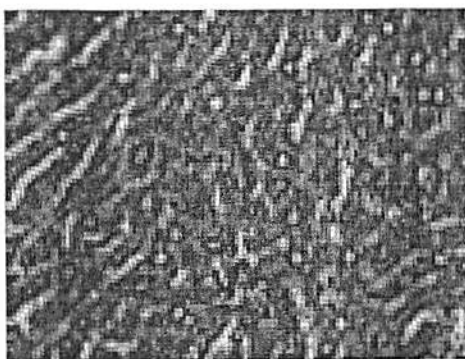
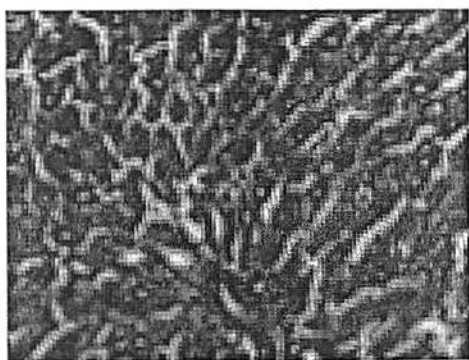




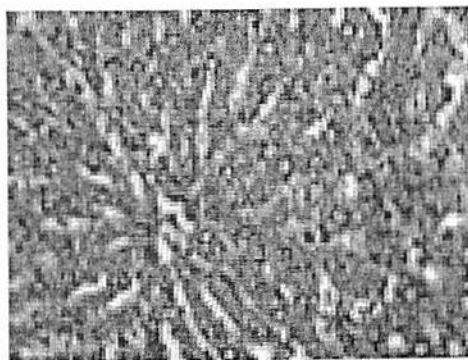
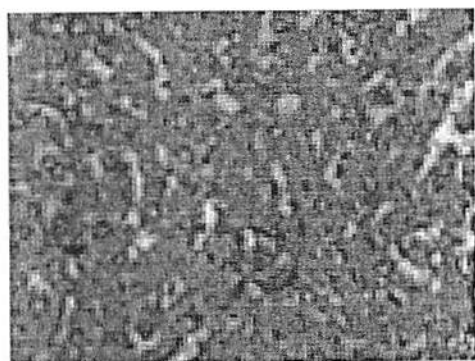
P 1-7

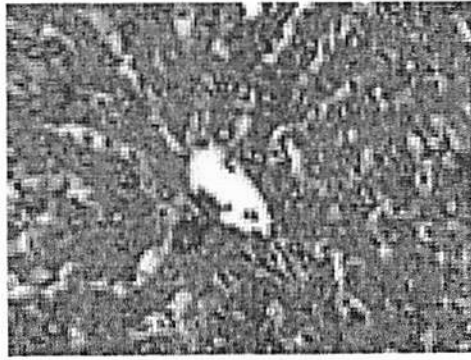
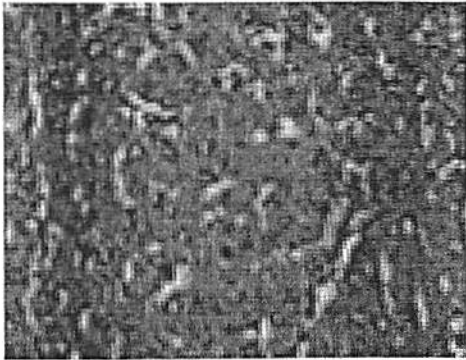


P 1-8

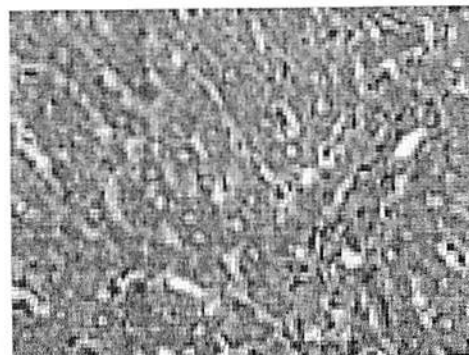
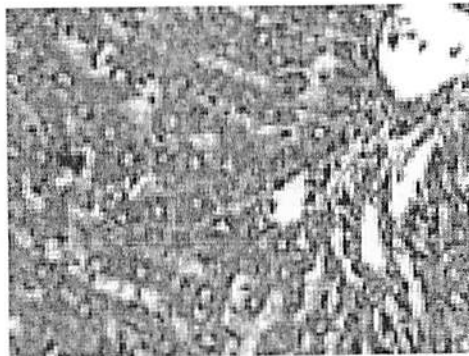
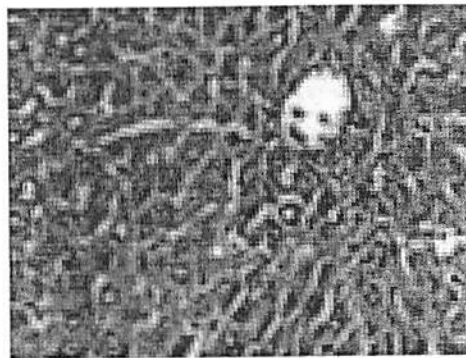


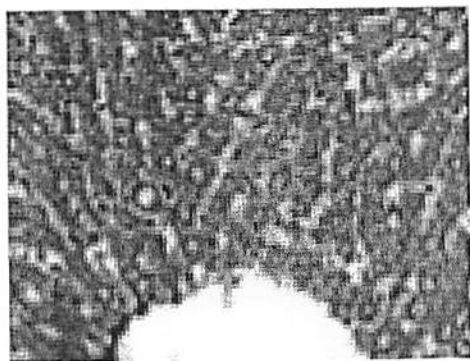
P 1-9



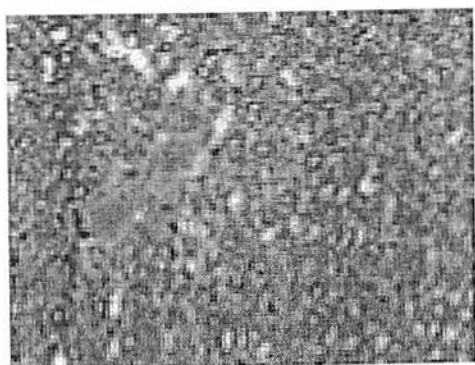
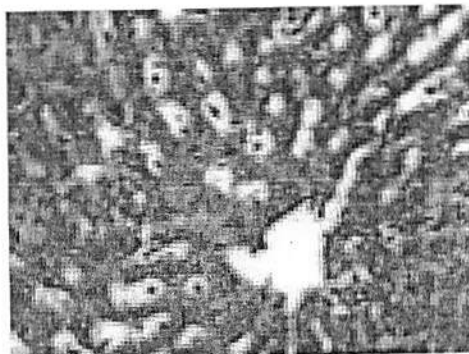
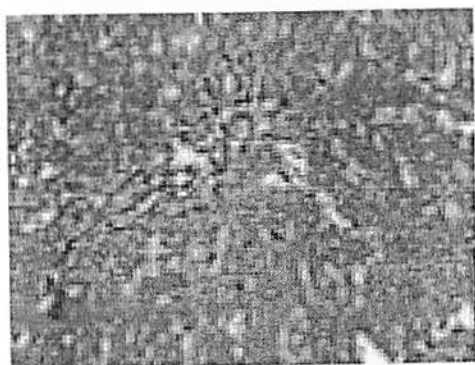
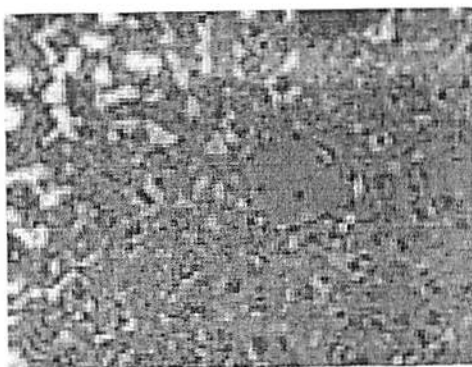


P 1-10

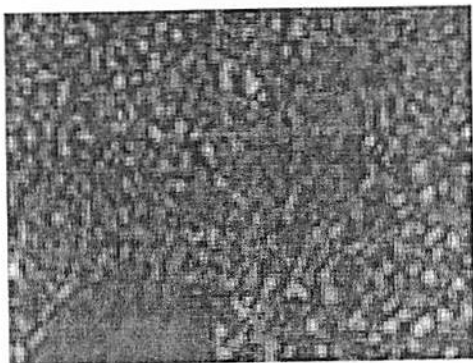
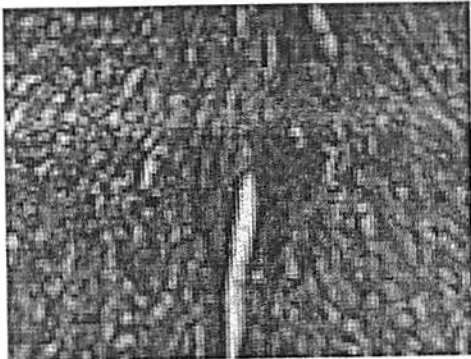
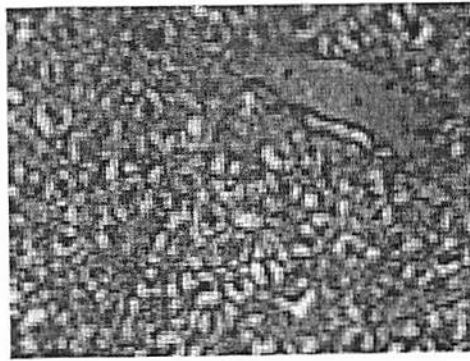
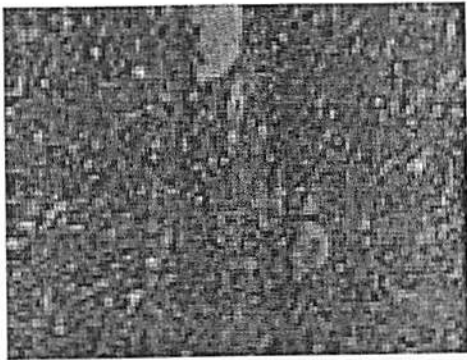




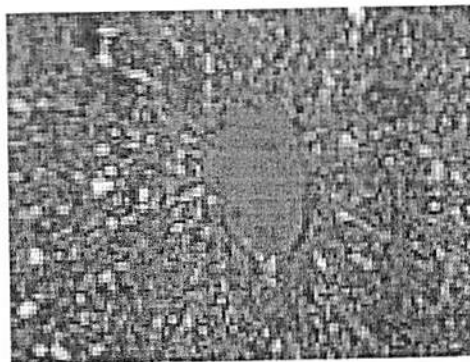
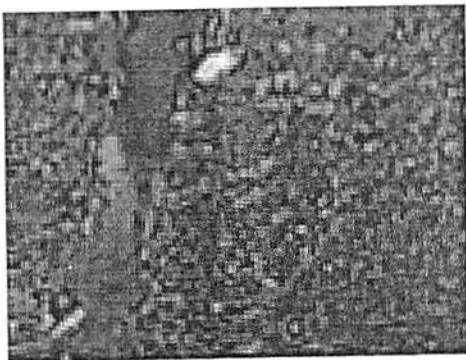
P 2-1

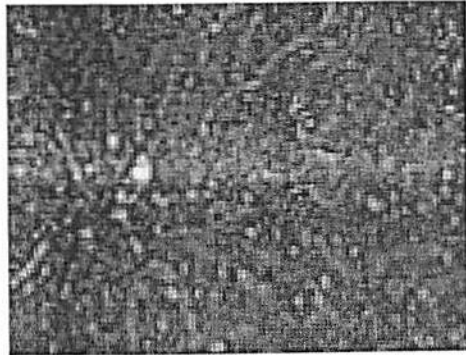
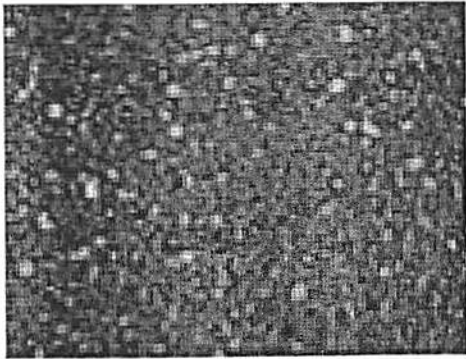


P 2-2

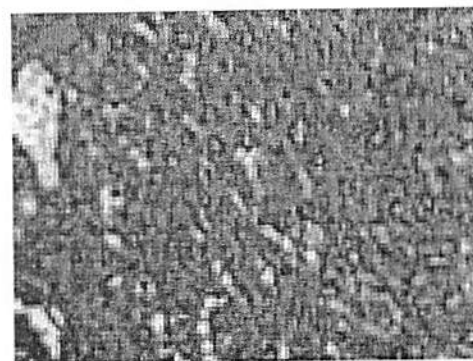
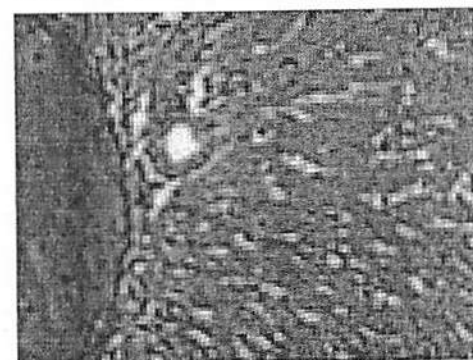
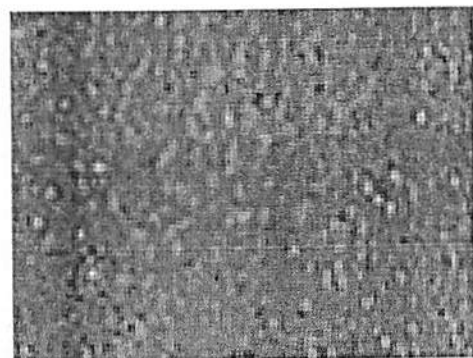


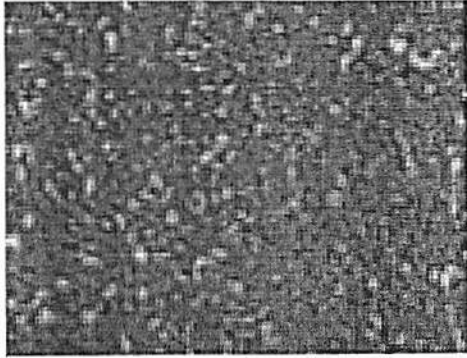
P 2-3



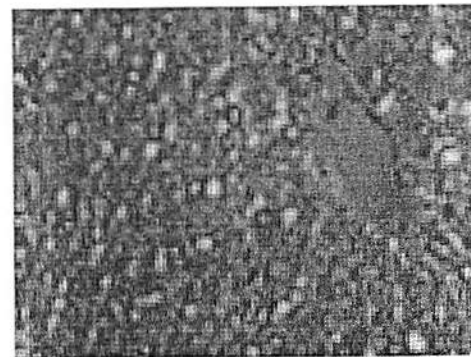
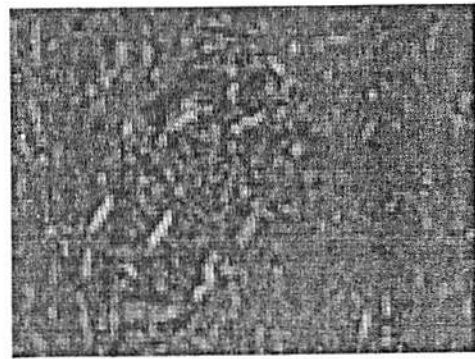
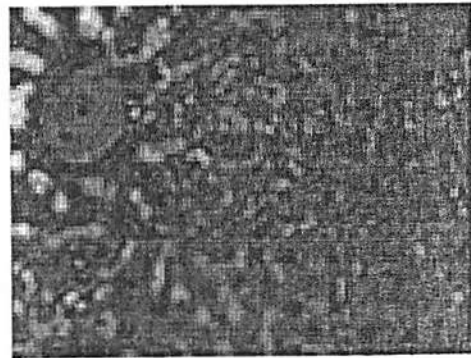
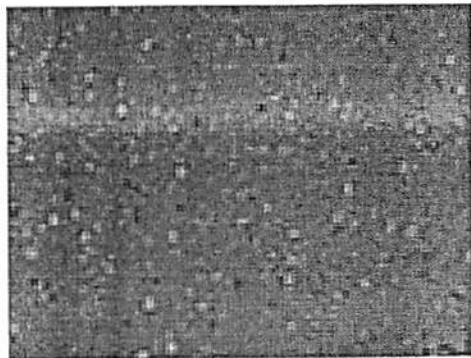


P 2-4

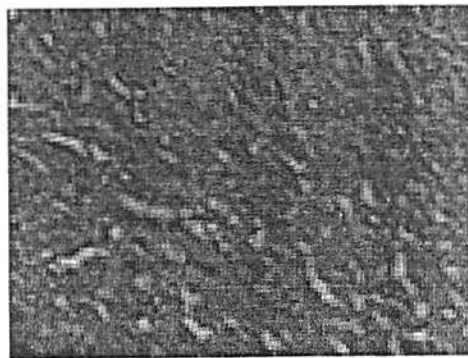
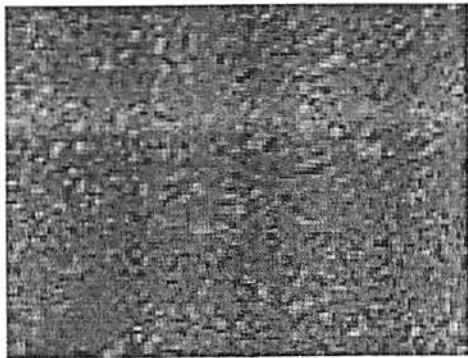
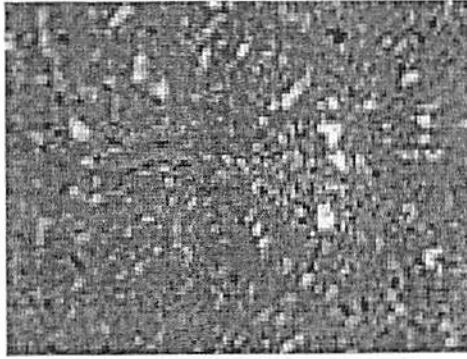
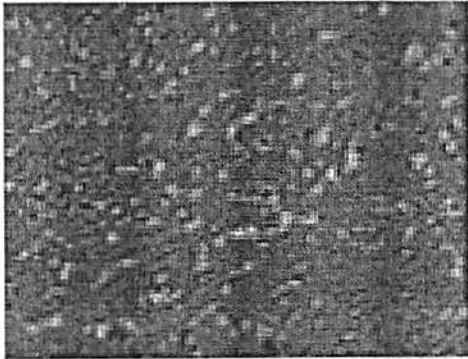




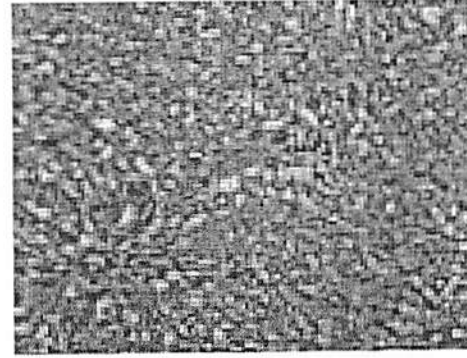
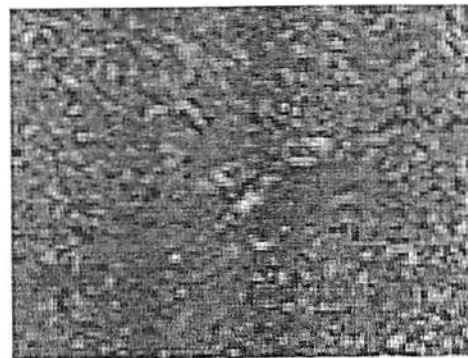
P 2-5

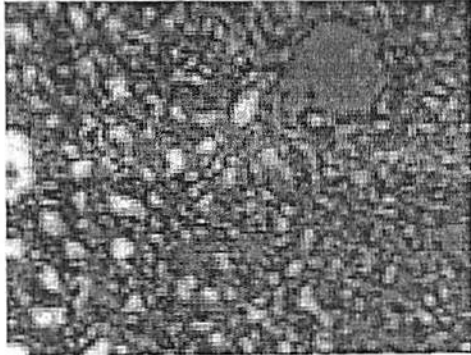
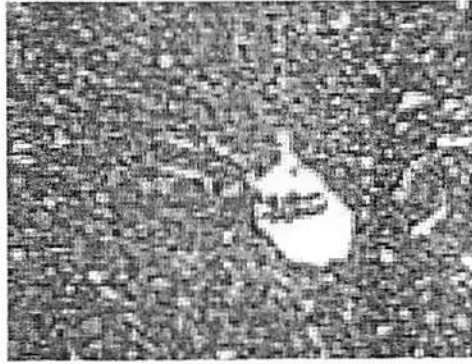
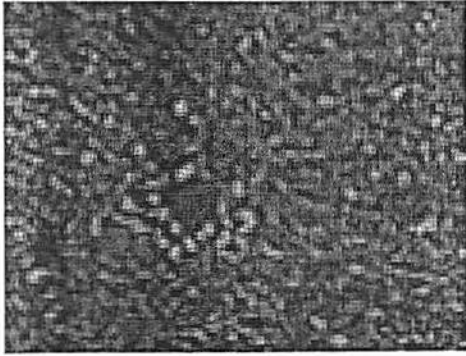


P 2-6

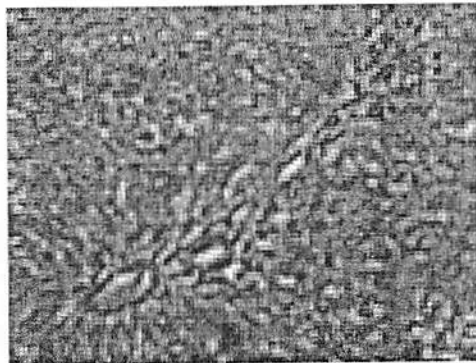
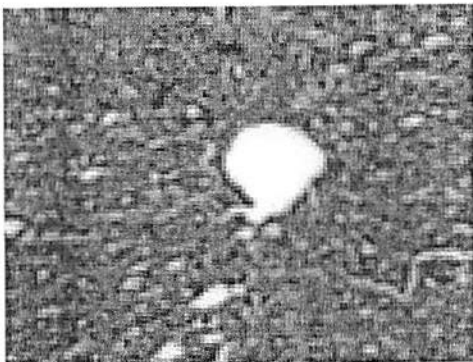
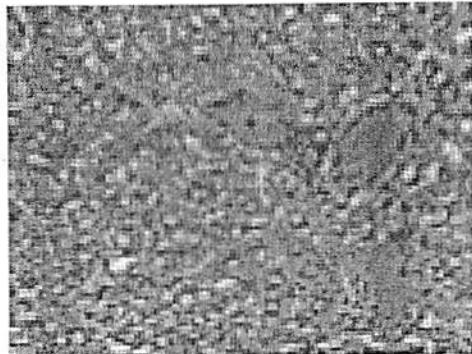
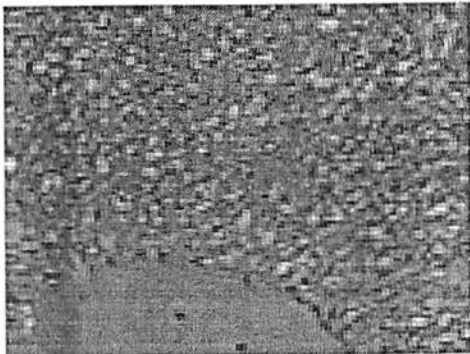


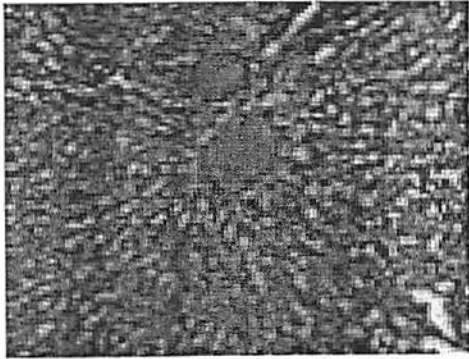
P 2-7



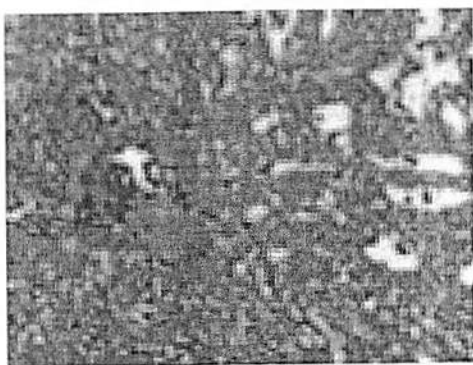
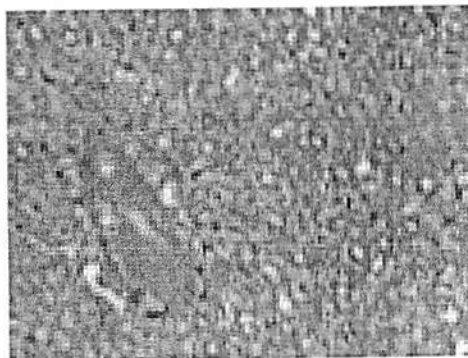
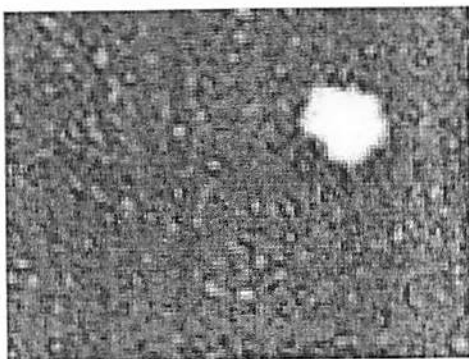
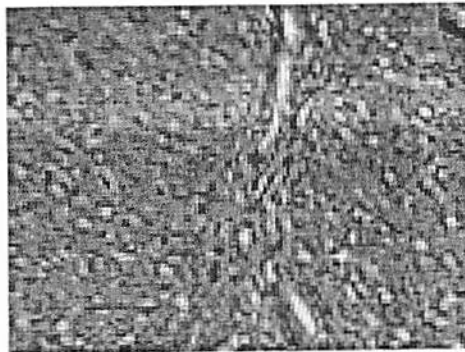
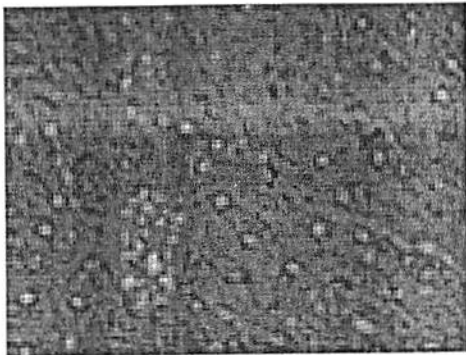


P 2-8

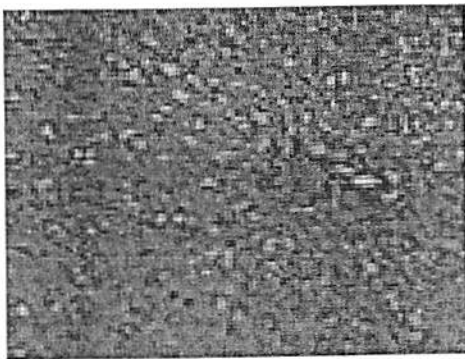
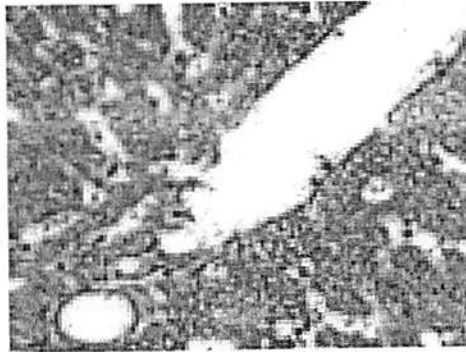
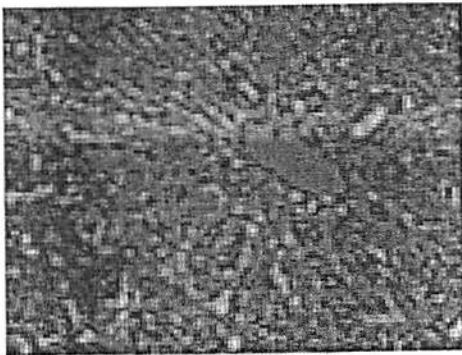
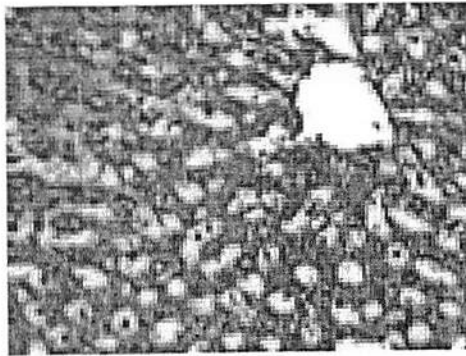
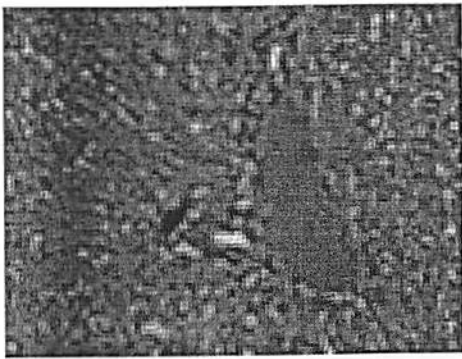




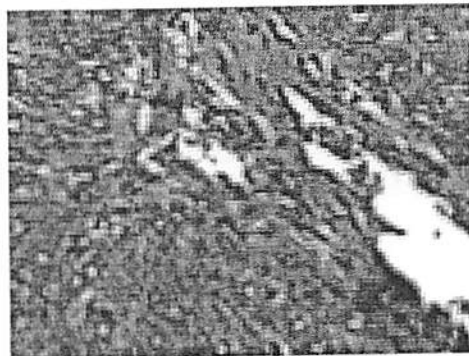
P 2-9

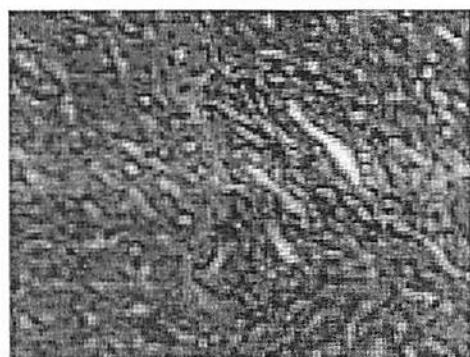
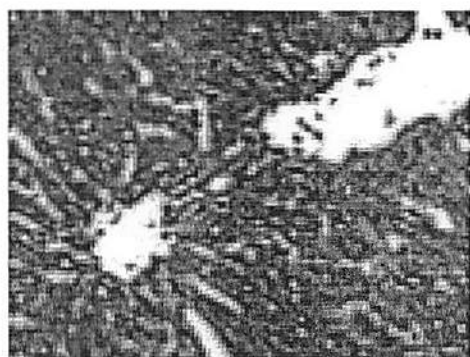


P 2-10

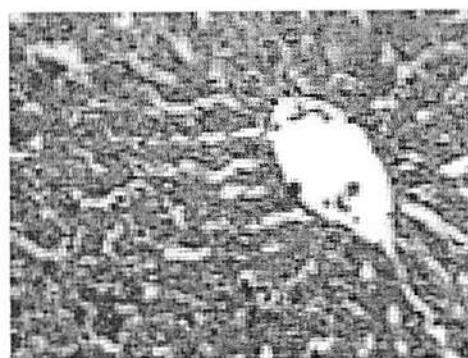
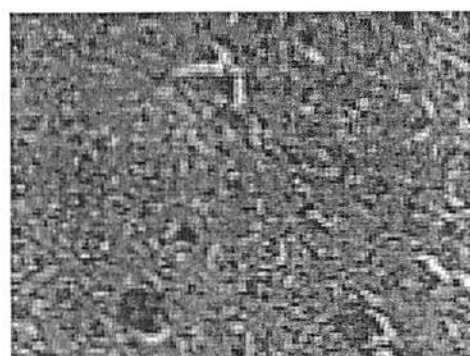


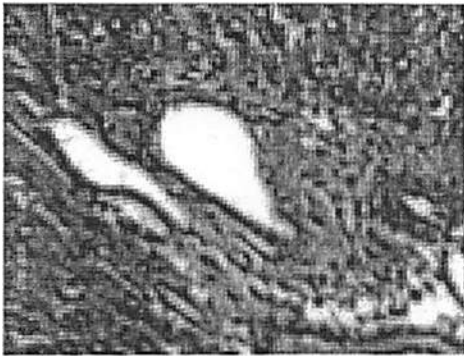
P 3-1



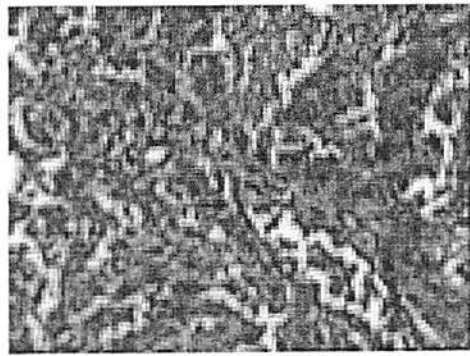
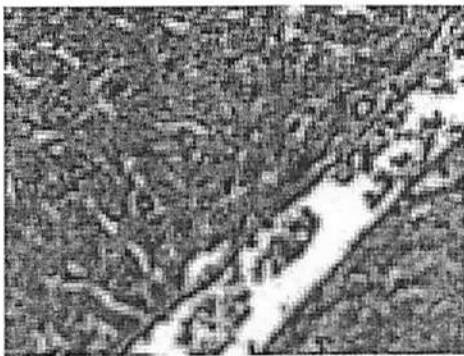
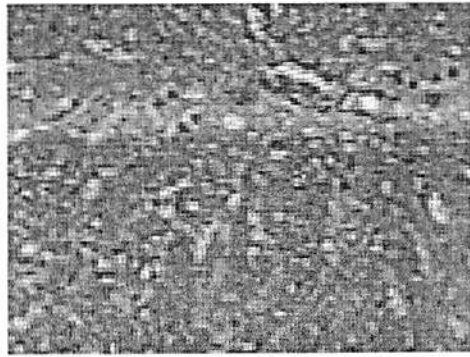
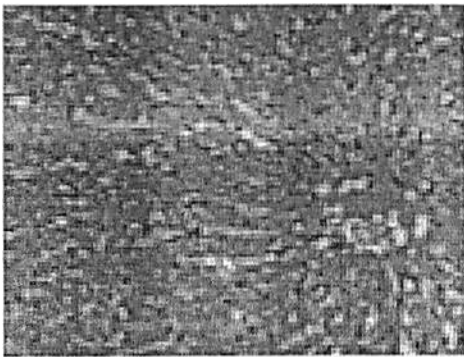


P 3-2

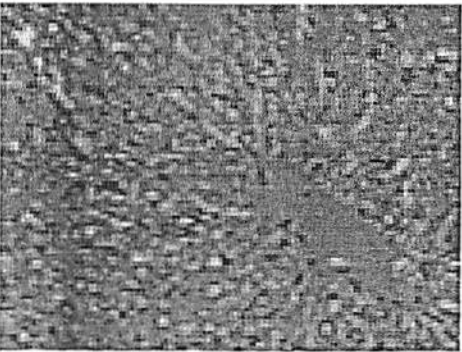
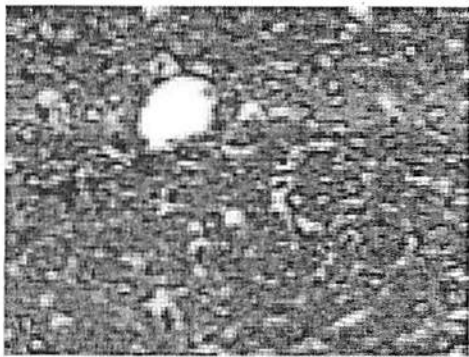
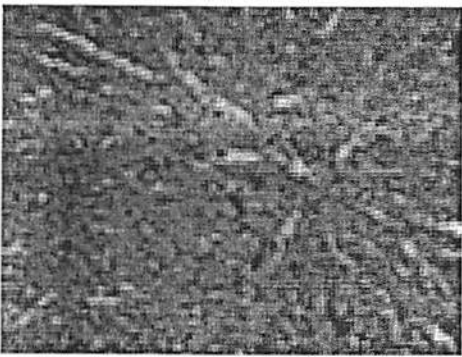
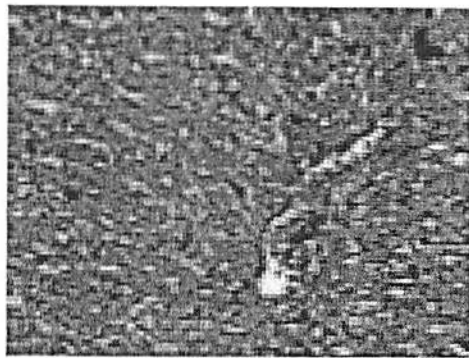




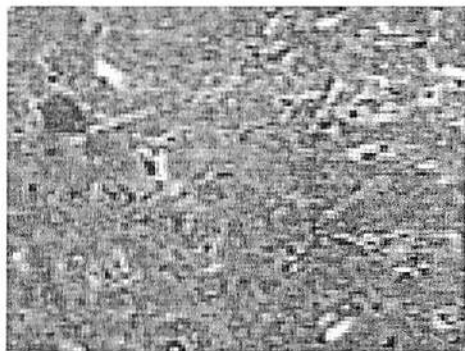
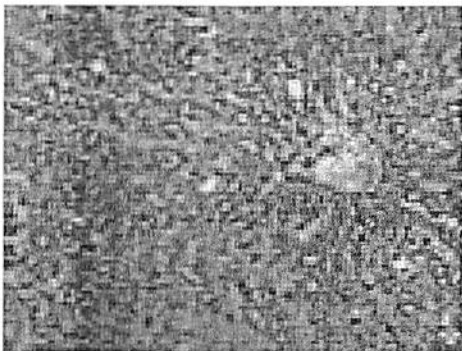
P 3-3

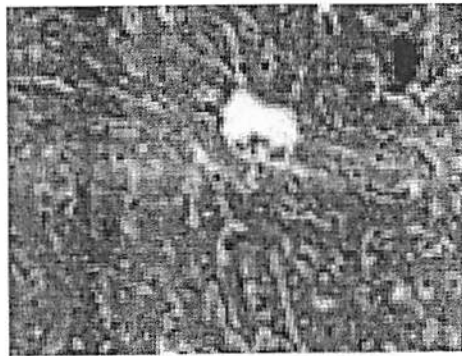


P 3-4

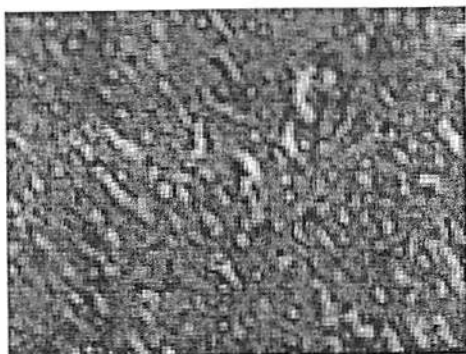


P 3-5



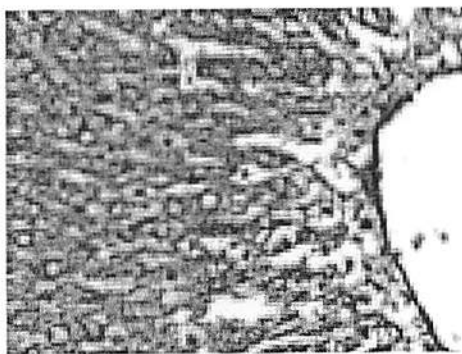
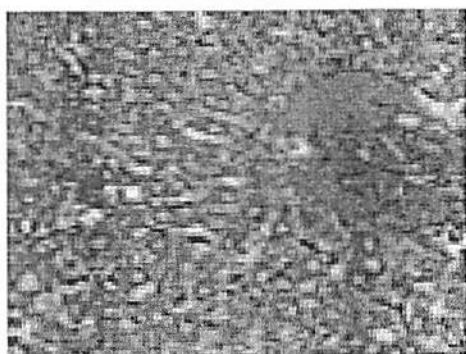
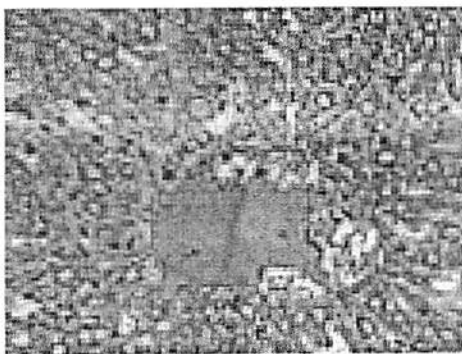


P 3-6

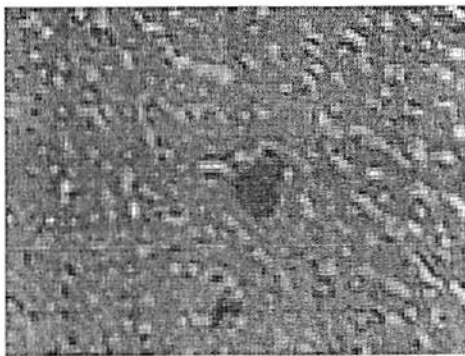
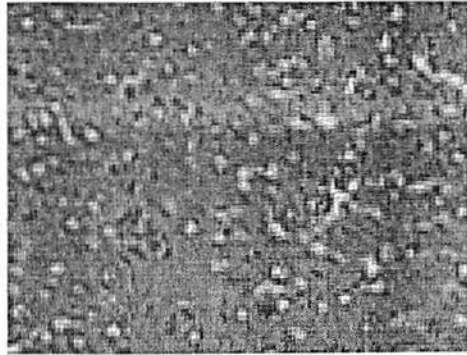
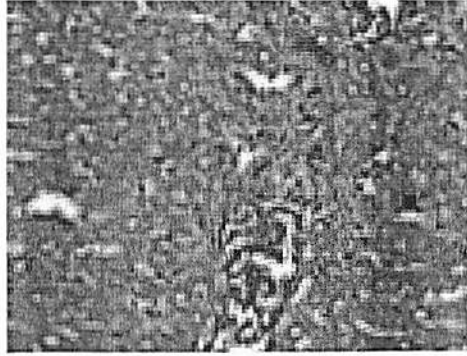
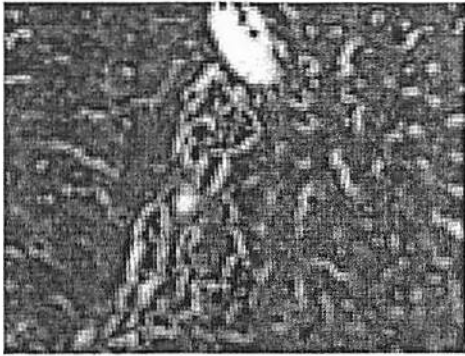




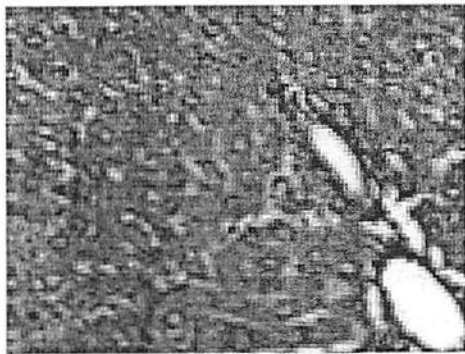
P 3-7

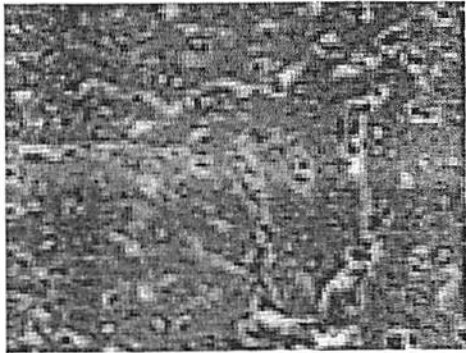


P 3-8

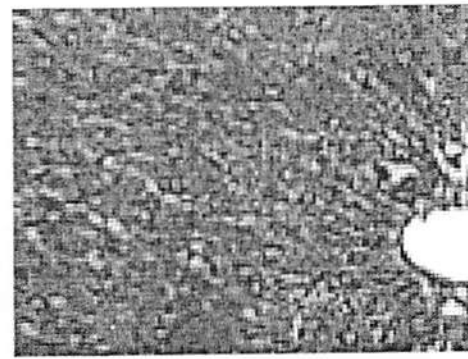
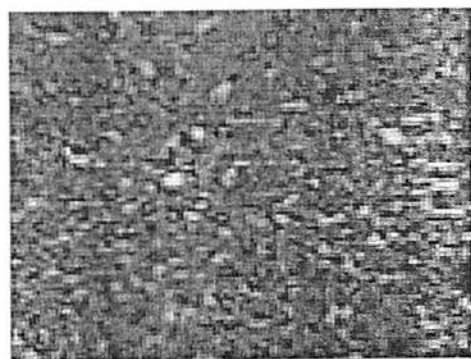
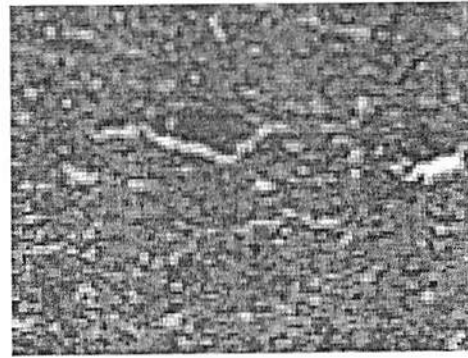
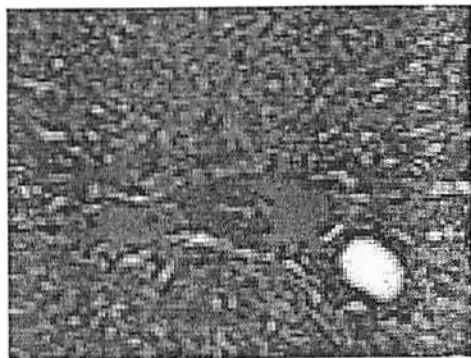


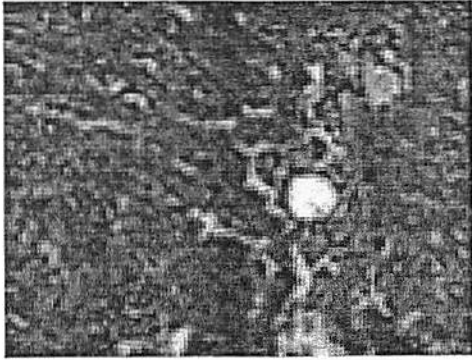
P 3-9



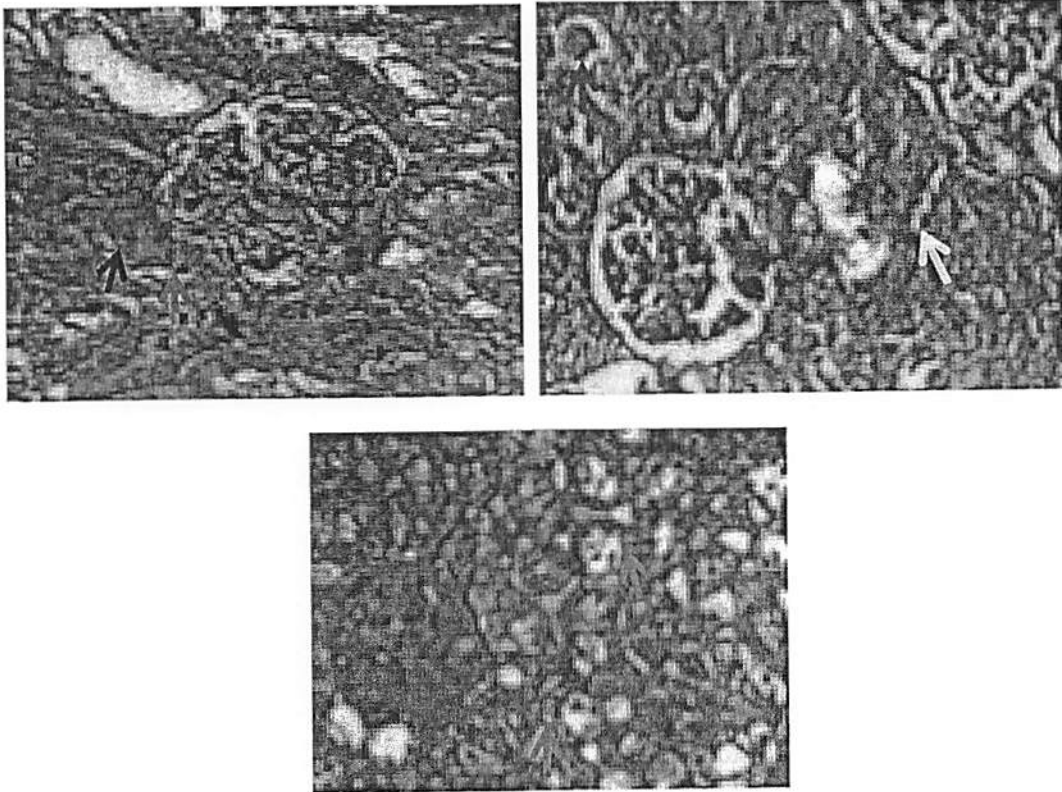


P 3-10





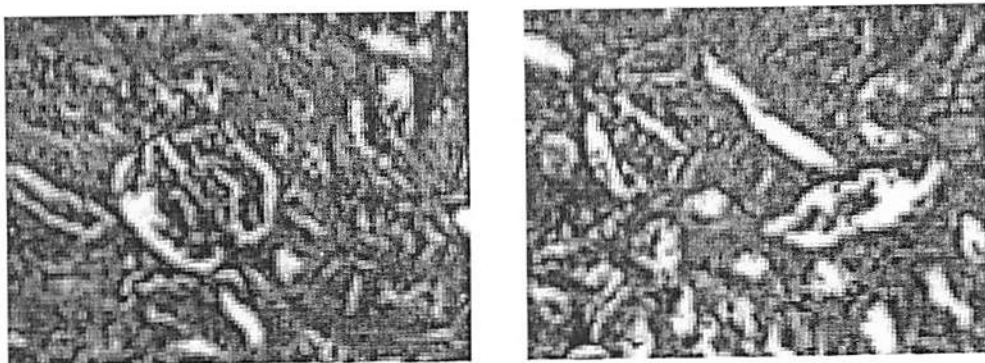
Ginjal

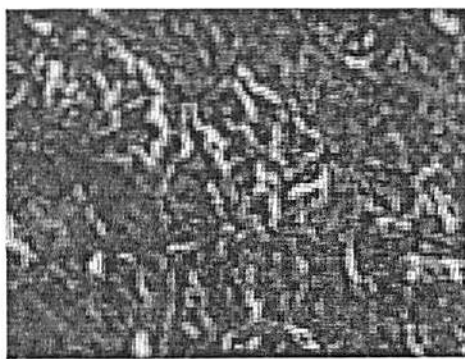
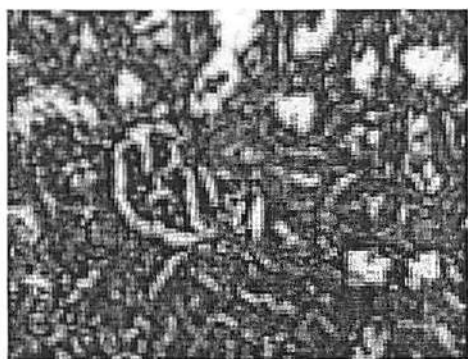


Gambar 2. Parameter perubahan histopatologi hepar. a. Granula cast (panah biru) b. Celluler Cast (panah hitam) c. Protein cast (panah merah) d. Degenerasi hidropik (panah hijau) e. Piknotis sel (panah kuning).

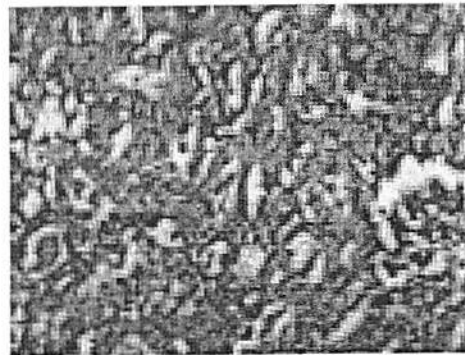
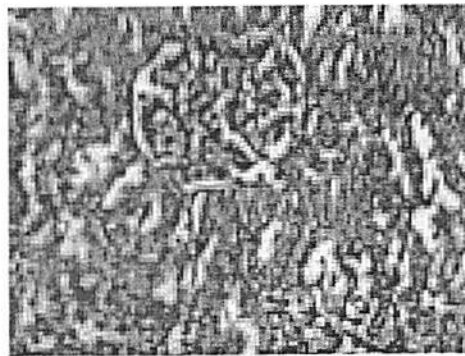
Ginjal

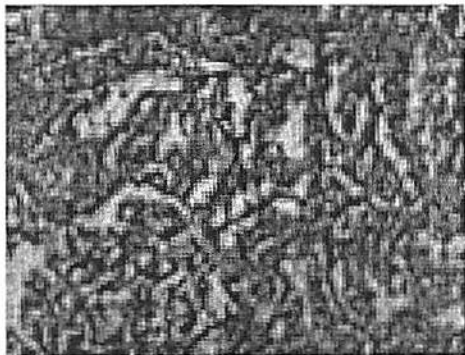
K 1



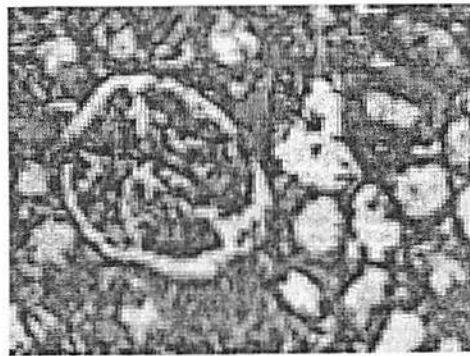
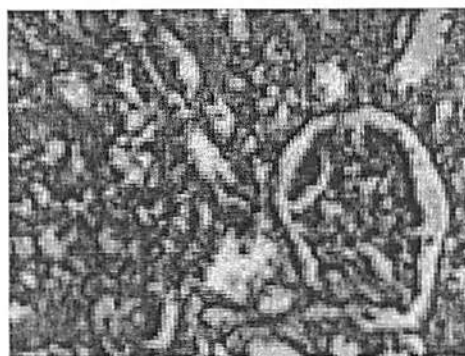
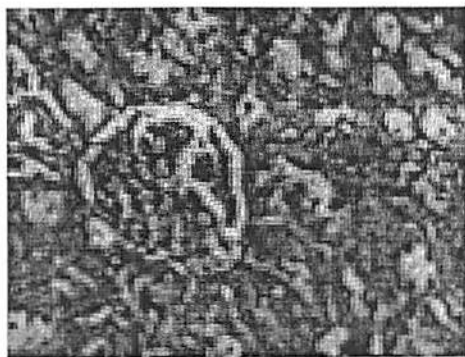


K 2





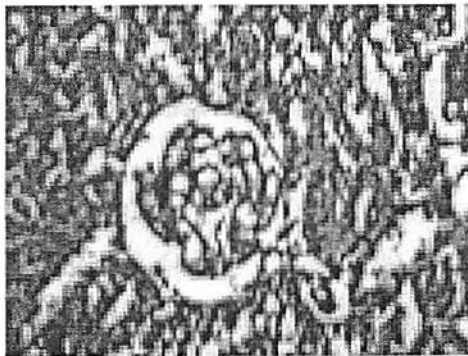
K 3

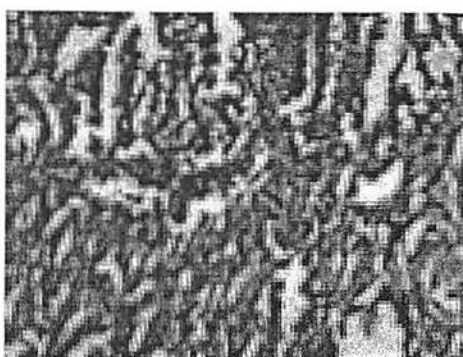
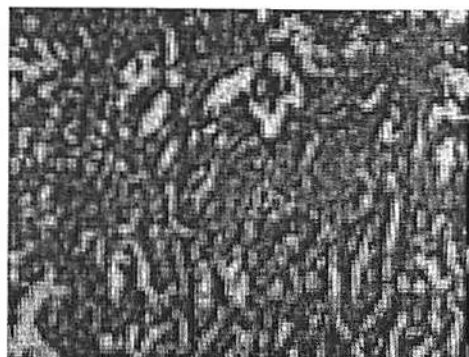


K 4

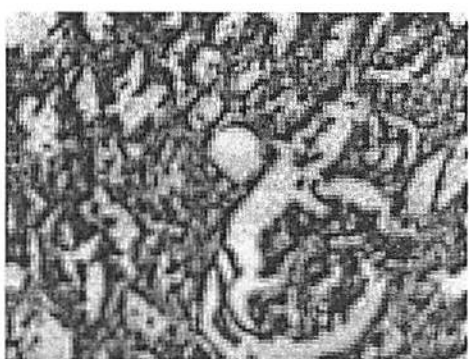


K 5



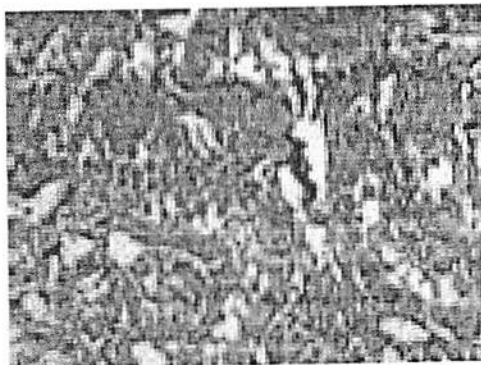


K 6

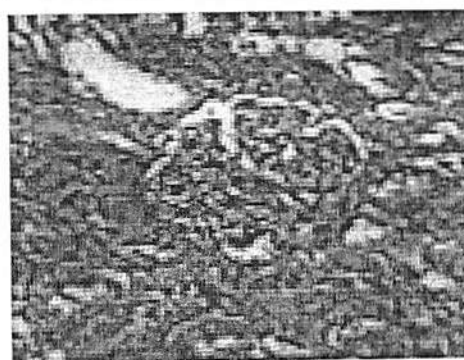
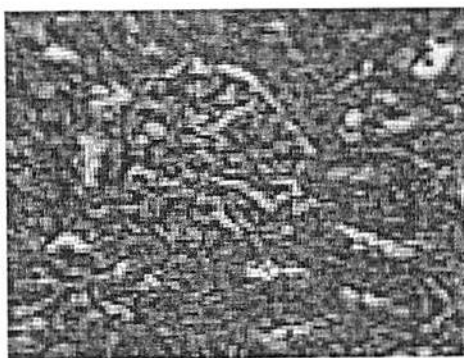




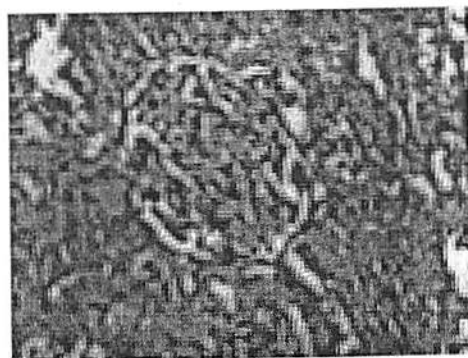
K 7



K 8

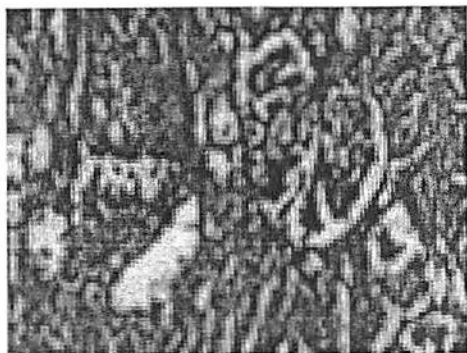


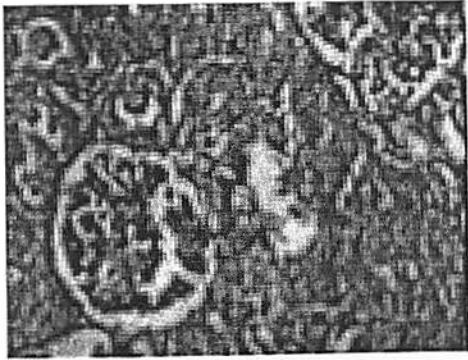
K 9



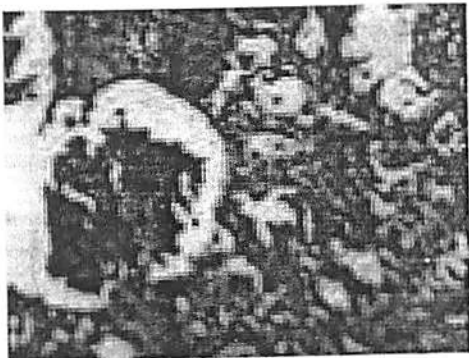
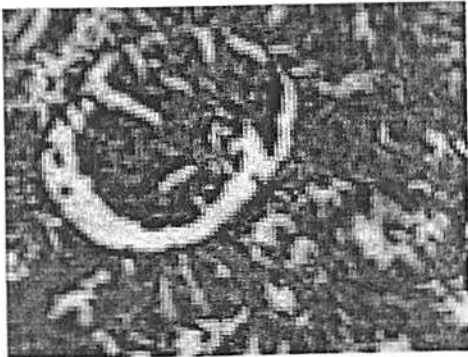
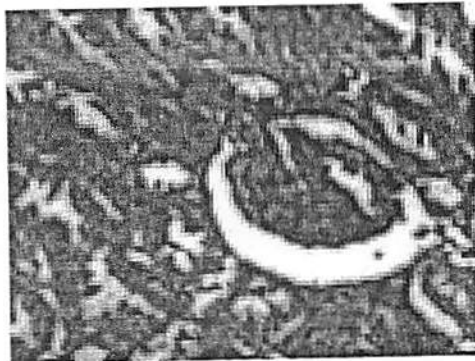
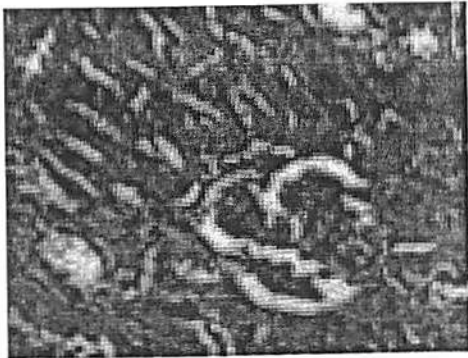


K 10

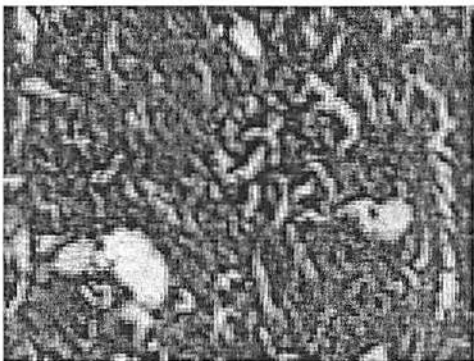
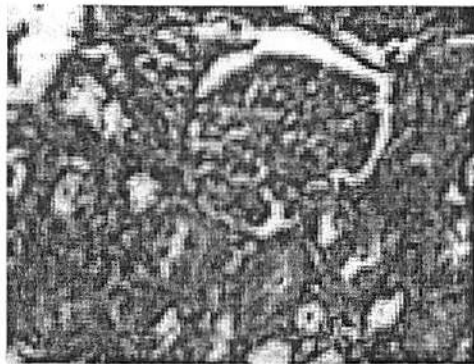




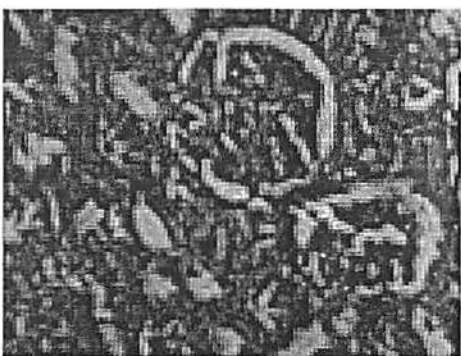
P 1-1

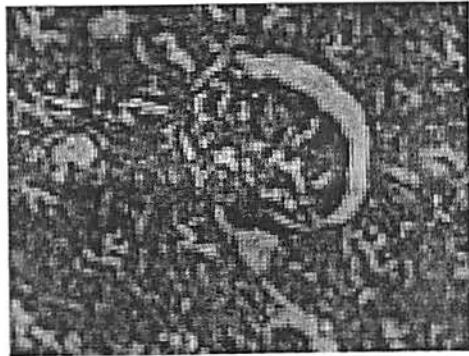
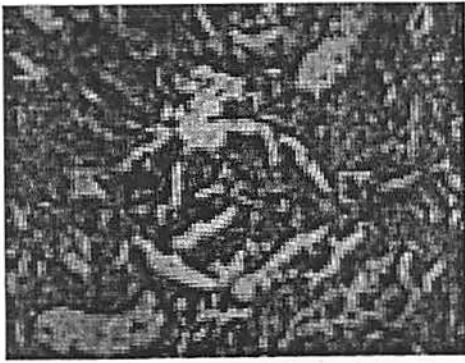


P 1-2

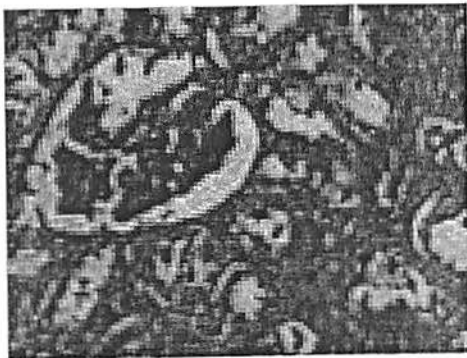


P 1-3



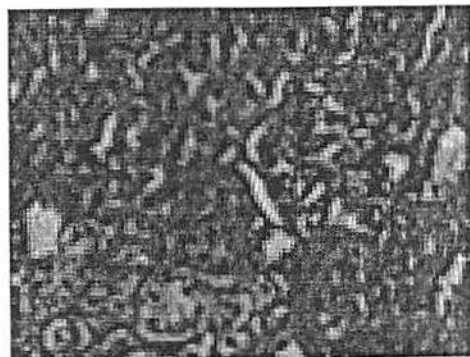
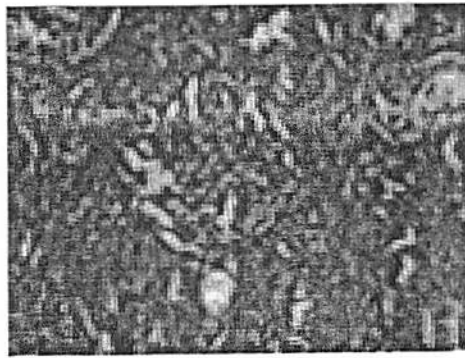


P 1-4

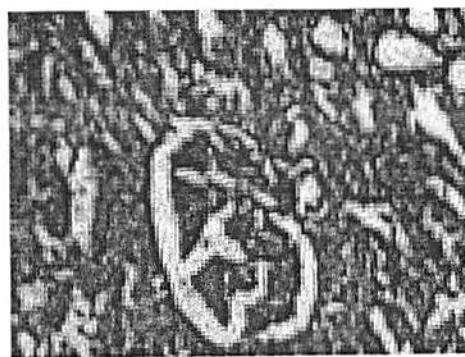
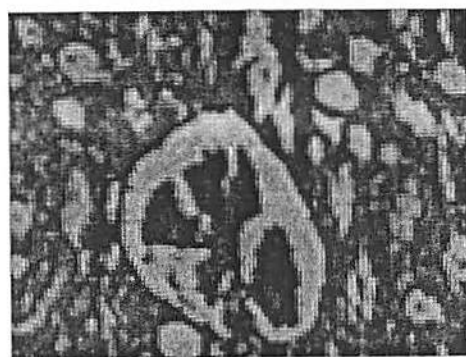
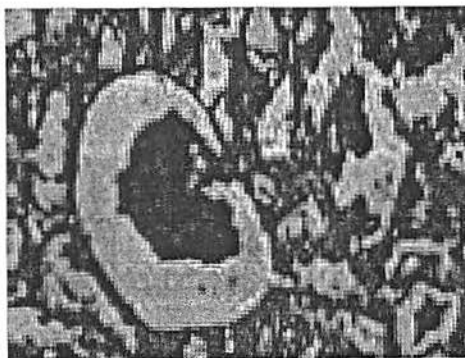
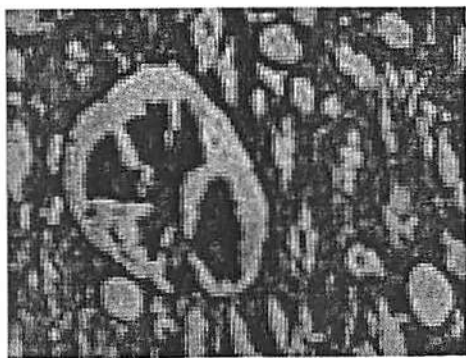




P 1-5

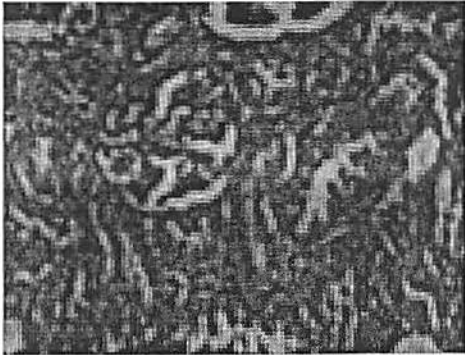
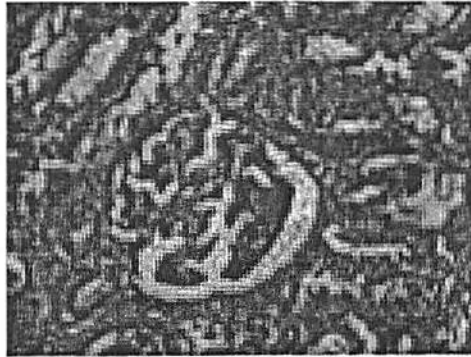
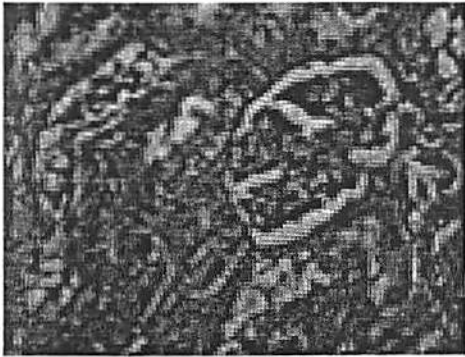


P 1-6

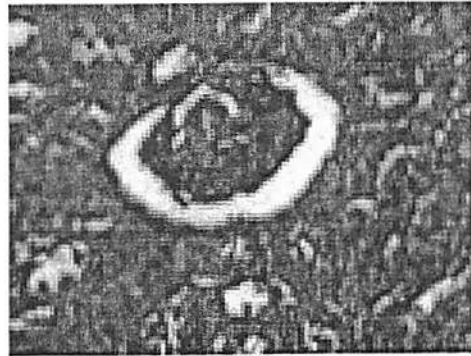
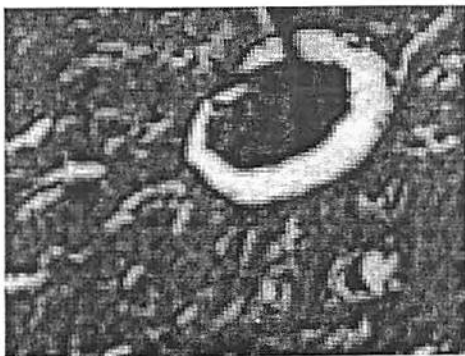
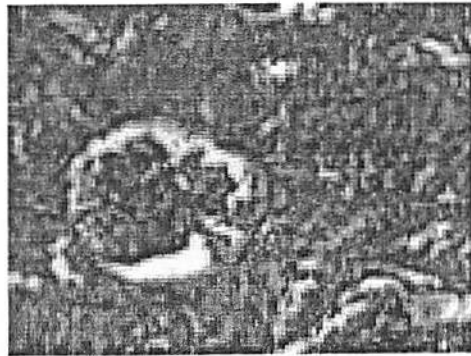
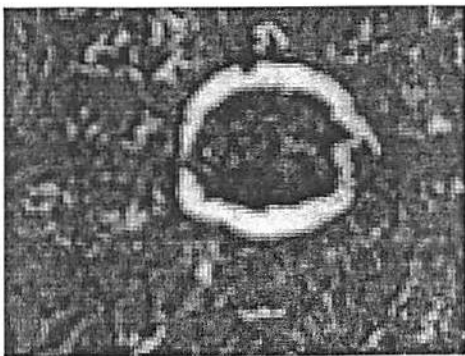


P 1-7



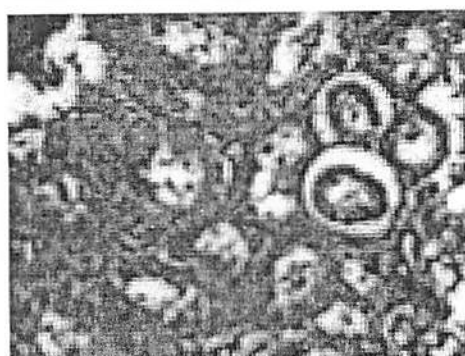
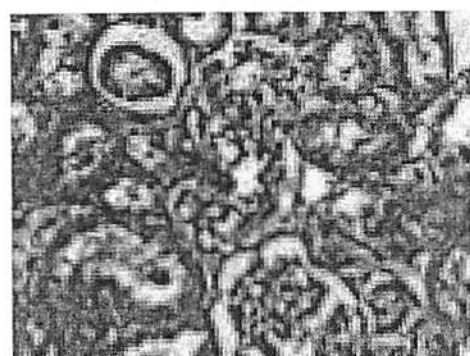
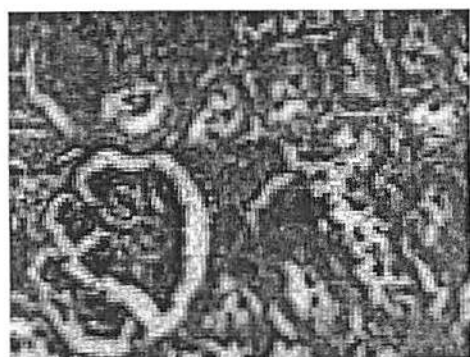


P 1-8

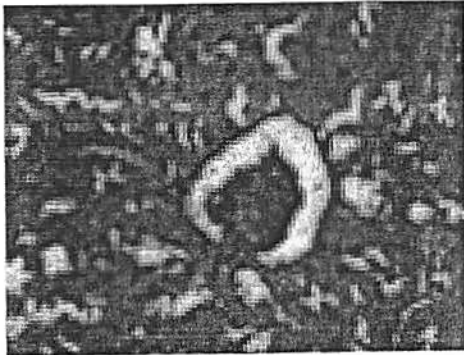
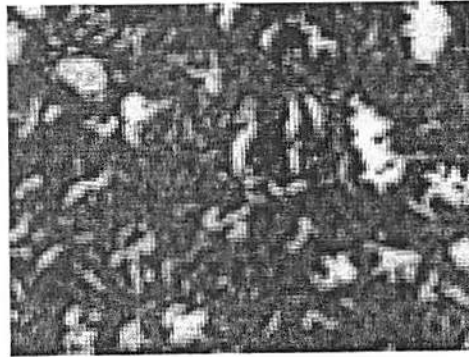
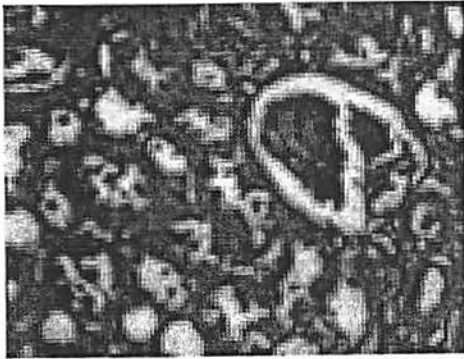




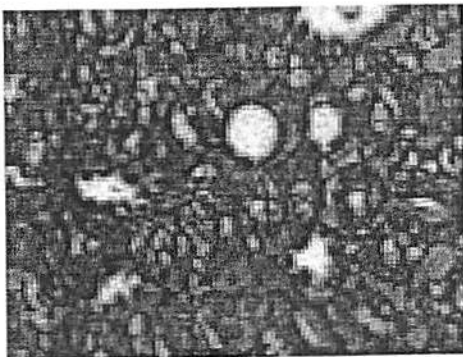
P 1-9

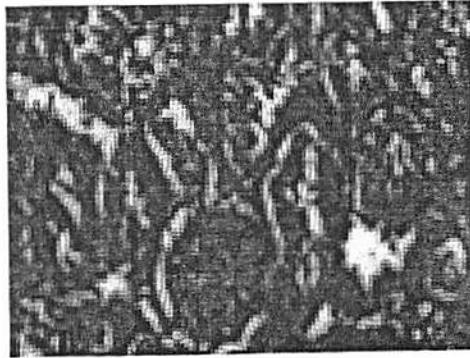


P 1-10

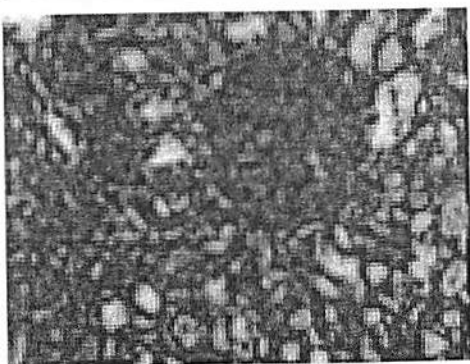
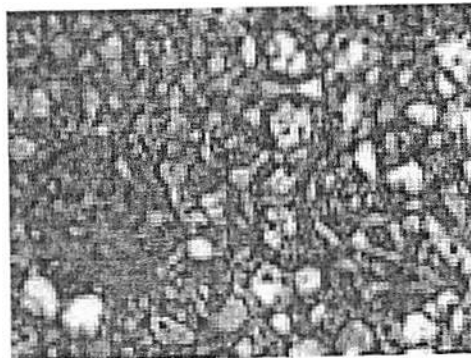
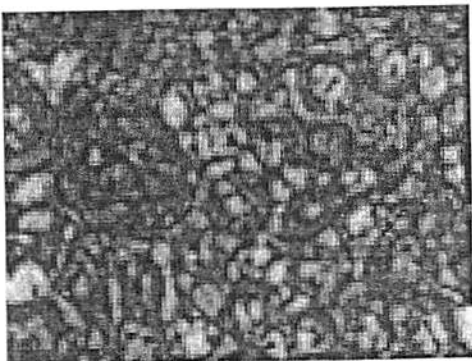


P 2-1



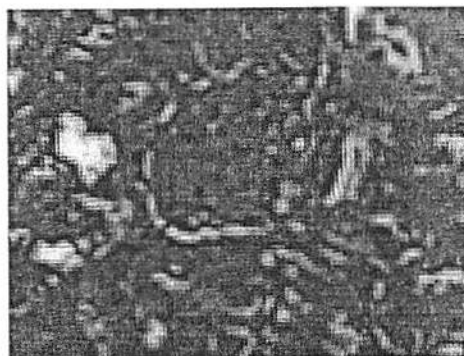
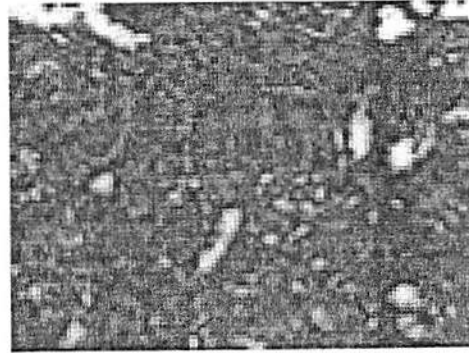


P 2-2

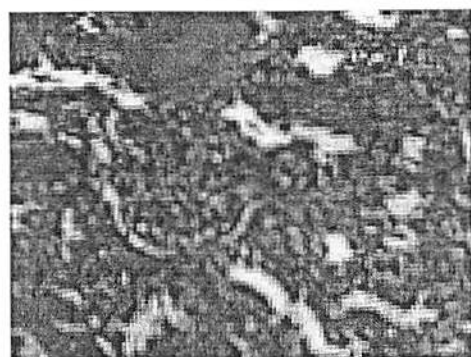
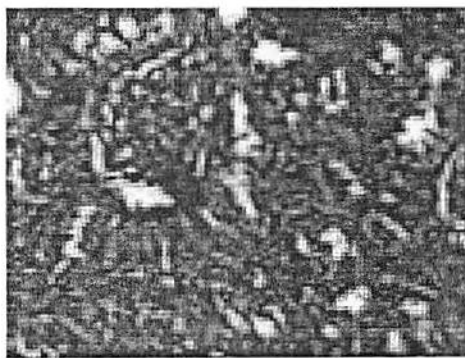
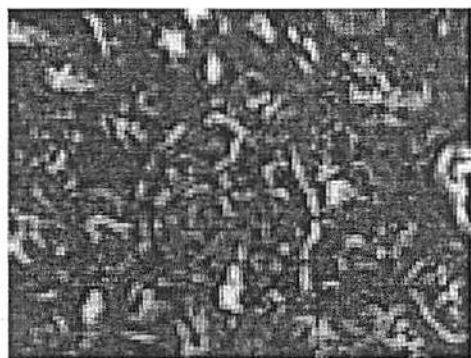




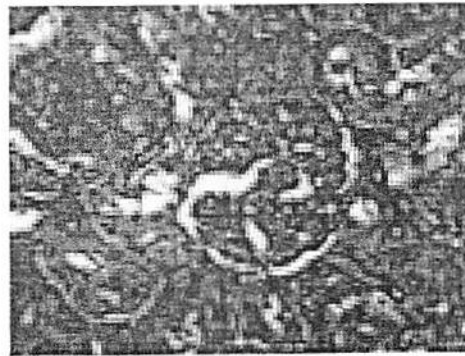
P 2-3

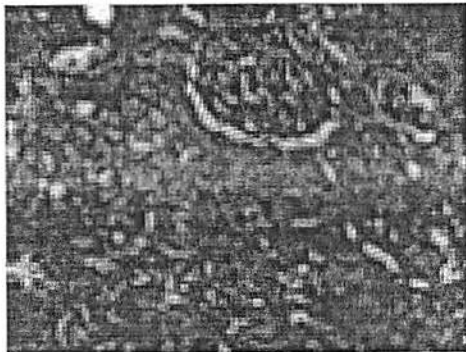
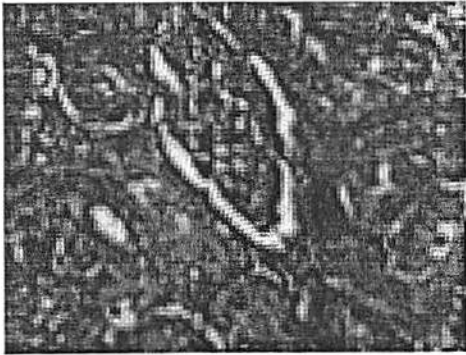


P 2-4

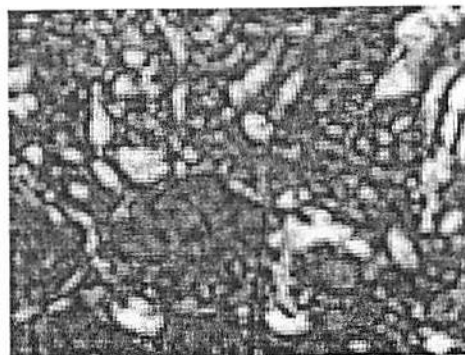
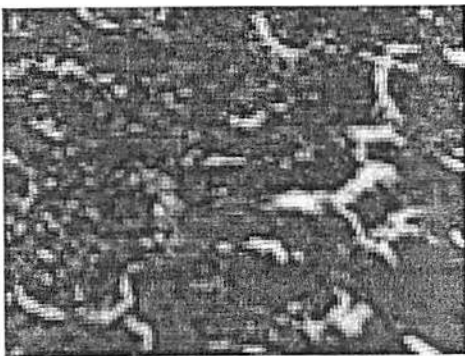


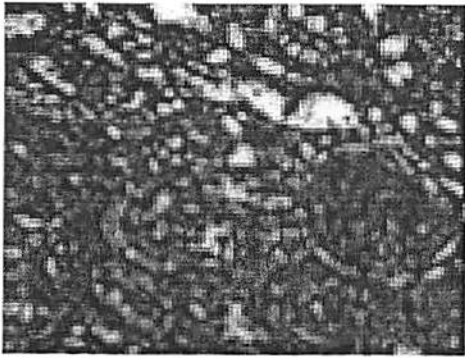
P 2-5



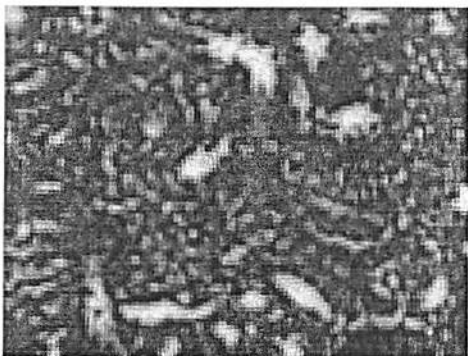
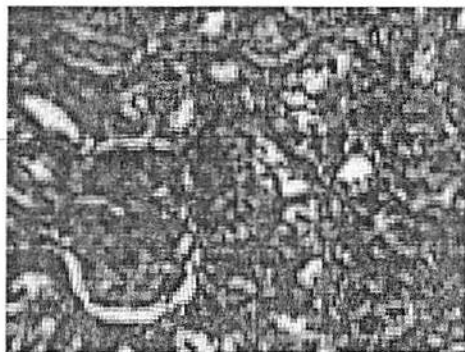
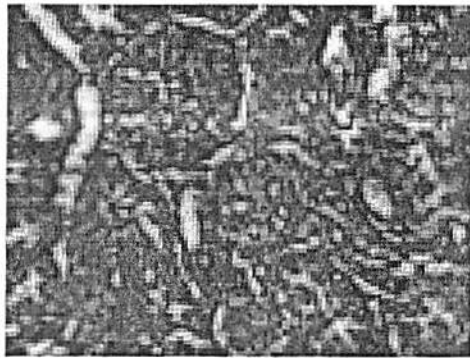
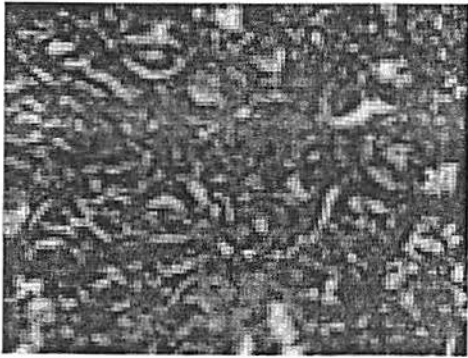


P 2-6

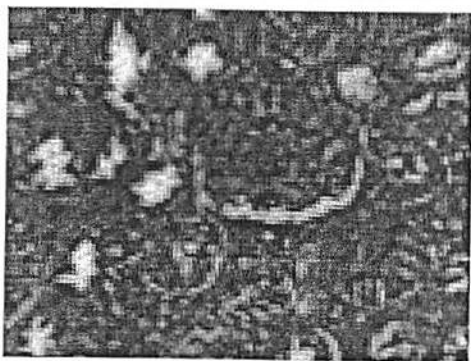
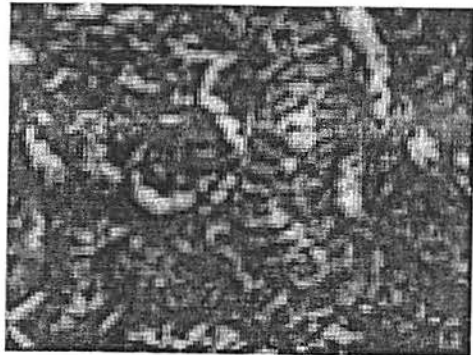




P 2-7



P 2-8

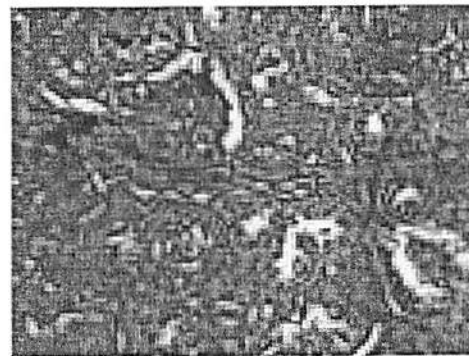
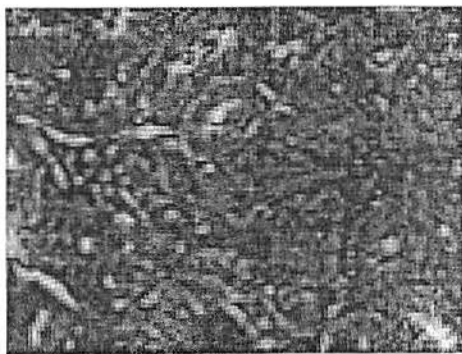


P 2-9





P 2-10

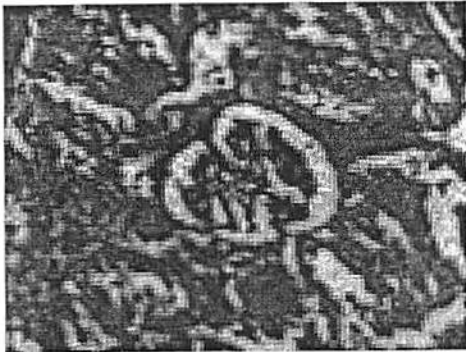
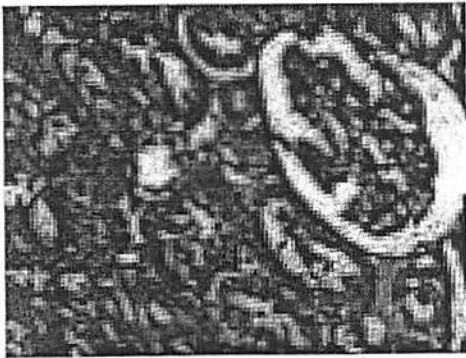




P 3-1

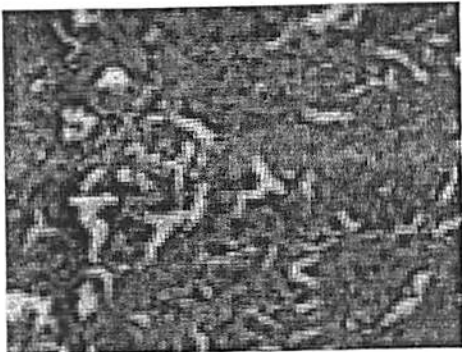
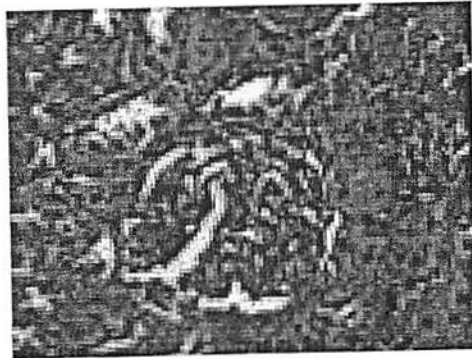


P 3-2



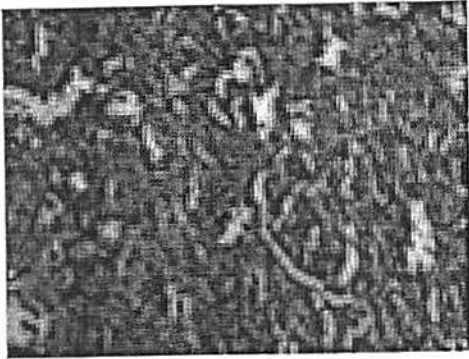
P 3-3



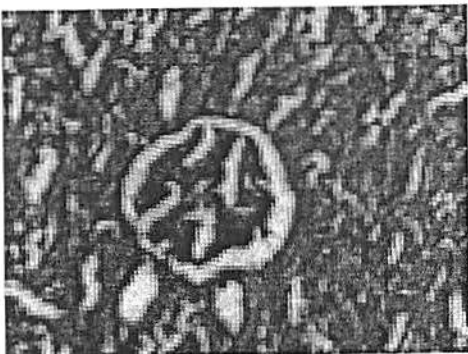
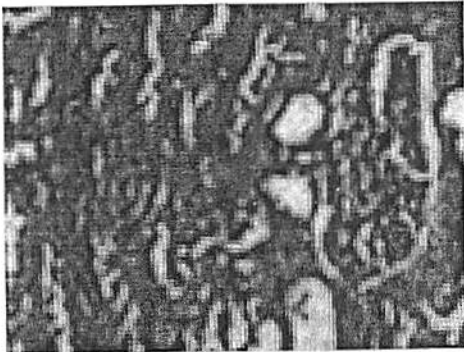


P 3-4

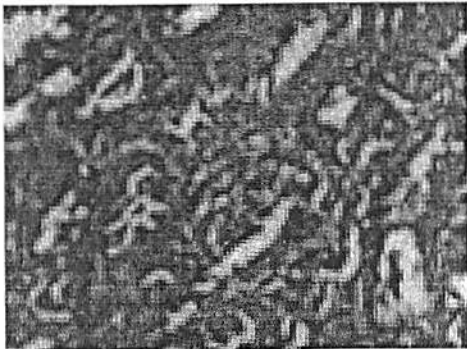
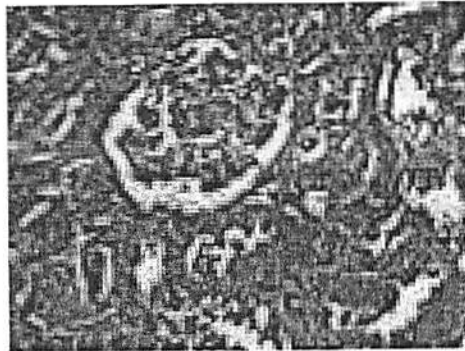
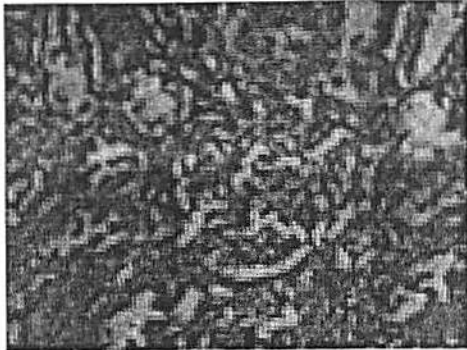
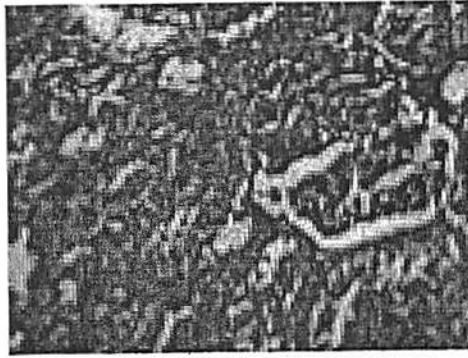
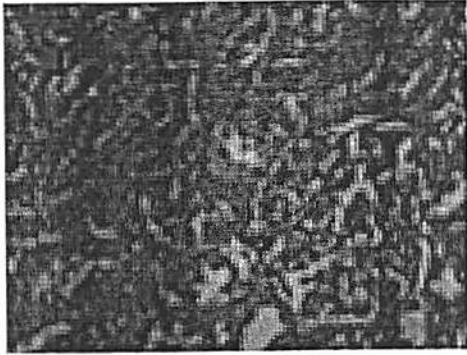




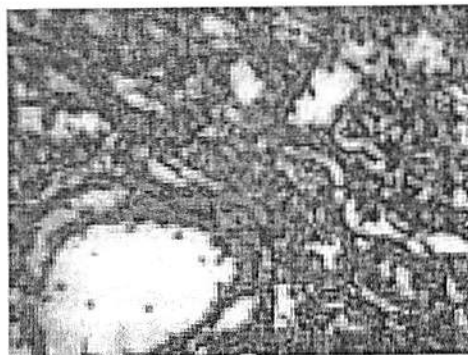
P 3-5

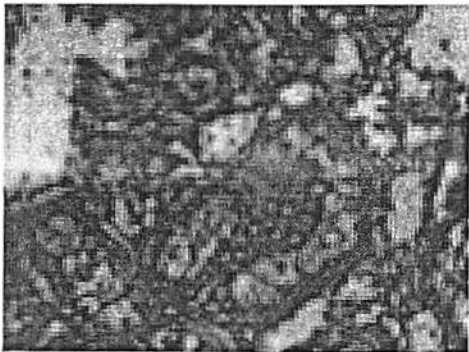
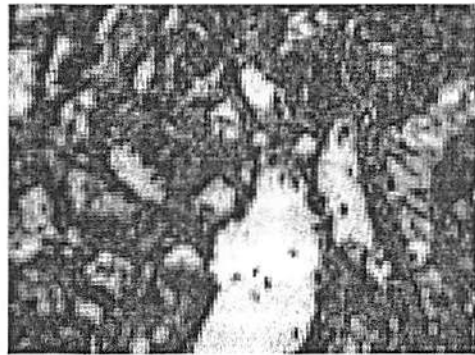


P 3-6



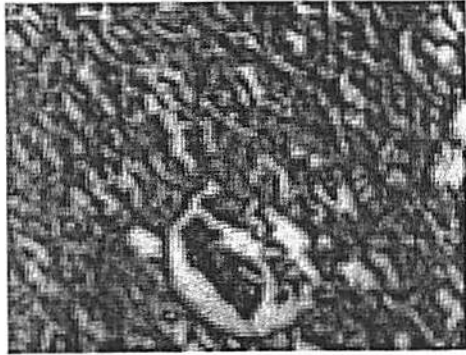
P 3-7



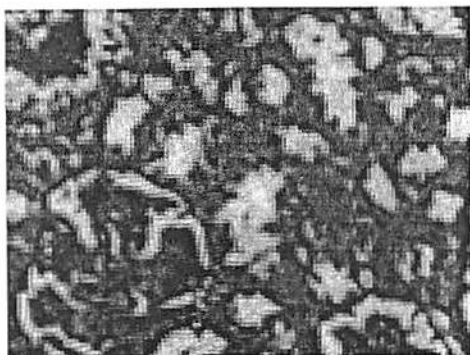
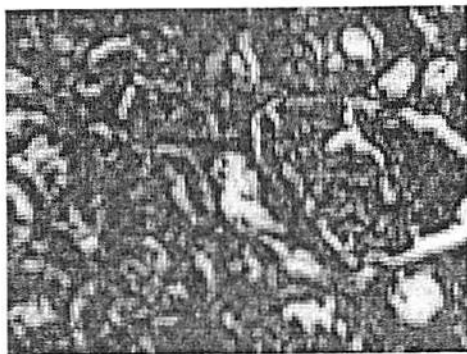
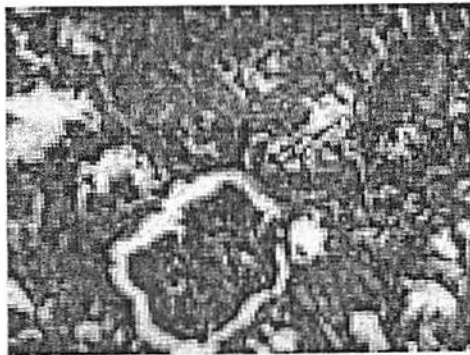


P 3-8

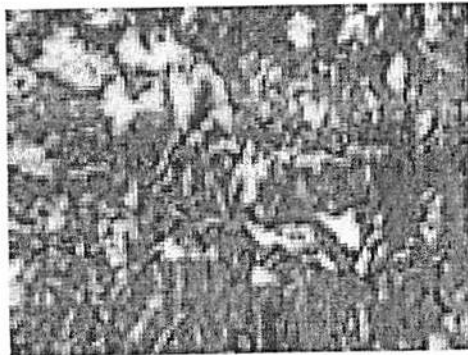




P 3-9



P 3-10



5.3 Pembagian Dosis

Dosis bahan uji yang diberikan pada hewan coba dalam uji toksisitas subkronik dapat dilihat pada tabel 5.6

Tabel 5.6 Dosis ekstrak etanol 70% daun *justicia gendarussa* terfraksinasi yang diberikan kepada hewan coba

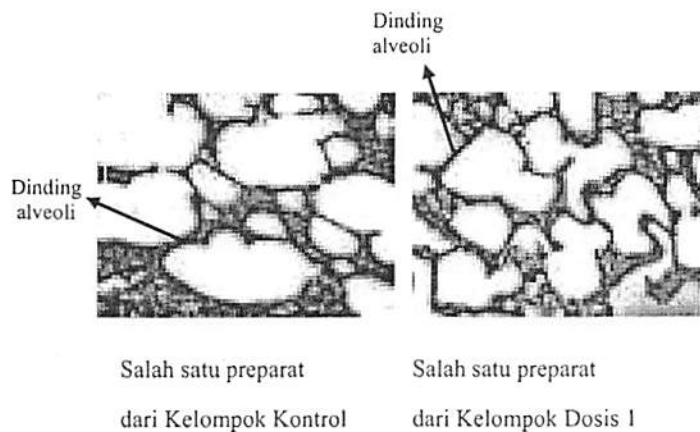
Kelompok Uji	Dosis Ekstrak yang Diberikan
Kontrol	Suspensi CMC-Na 0,5 %
Dosis I	40 mg/kg BB
Dosis II	200 mg/kg BB
Dosis III	1000 mg/kg BB

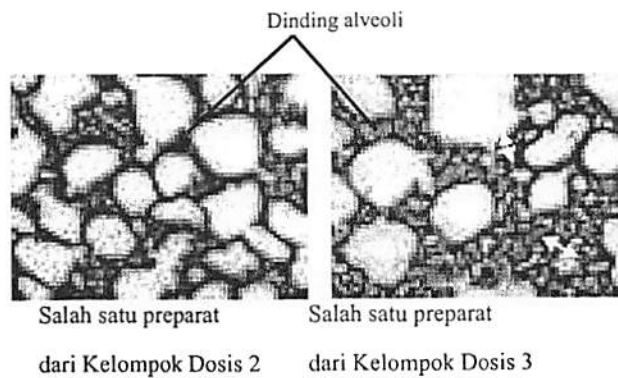
5.4 Pemeriksaan Histopatologi Organ Tikus

5.4.1 Pemeriksaan Histopatologi Paru Tikus

Pengambilan data dilakukan pada pembesaran 100x dan 400x menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon Eclipse E-100* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel.

Pengukuran tebal dinding alveoli dilakukan menggunakan image raster 3.0. Pengamatan dilakukan pada 15 dinding alveoli yang berbeda. Gambar dari pengukuran tebal dinding alveoli pada perbesaran 400x dapat dilihat pada Gambar 5.1





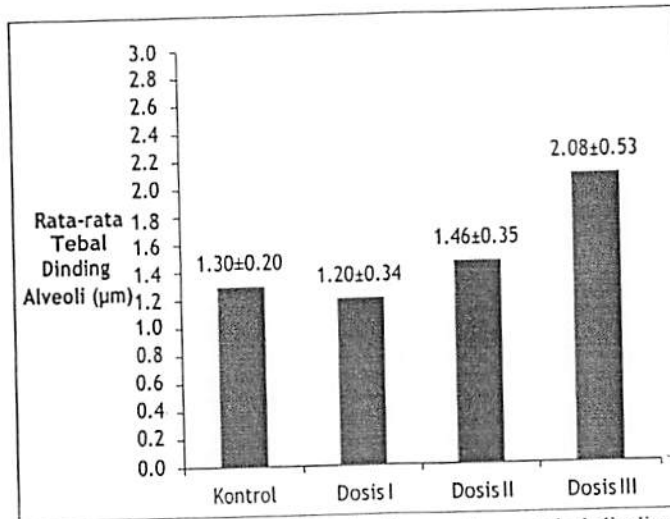
Gambar 5.1 Gambaran histopatologi paru dengan pewarnaan HE pada perbesaran 400x

Dari pengukuran tebal dinding alveoli pada preparat histopatologi paru tersebut didapat hasil seperti tertera pada Tabel 5.7 dan diagram dari hasil tersebut dapat dilihat pada gambar 5.2

Tabel 5.7 Hasil pengukuran tebal dinding alveoli pada pengamatan preparat histopatologi paru tikus

Kelompok	Rata-Rata Tebal Dinding Alveoli (μm)
Kontrol	$1.30^a \pm 0.20$
Dosis I	$1.20^a \pm 0.34$
Dosis II	$1.46^a \pm 0.35$
Dosis III	$2.08^b \pm 0.53$

Keterangan : Huruf *superscript* yang berbeda menyatakan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antar kelompok



Gambar 5.2 Diagram batang rata-rata hasil pengukuran tebal dinding alveoli

Uji homogenitas dilakukan dengan metode Levene didapatkan *p-values* sebesar 0,05, *p-value* sama dengan 5% maka H_0 diterima artinya data pengukuran tebal dinding alveoli memiliki varians yang homogen. Lalu uji distribusi menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov didapatkan *p-value* sebesar 0,200 *p-value* lebih besar dari 5% maka H_0 diterima artinya data berdistribusi normal, sehingga dapat dilakukan uji statistik parametrik dengan metode *One-Way Anova*.

Hasil uji *One-Way Anova* didapatkan *p-value* sebesar 0,00, *p-value* kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya pemberian ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. Gendarussa* memberikan pengaruh yang signifikan terhadap ketebalan dinding alveoli pada paru tikus. Dikarenakan hasil *One-Way Anova* menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan uji *Post Hoc Test*. Hasil uji *Post Hoc Test* dapat dilihat pada tabel 5.8.

Tabel 5.8 Hasil uji *post hoc test* pengukuran tebal dinding alveoli pada pengamatan preparat histopatologi paru tikus

	Kontrol	Dosis I	Dosis II	Dosis III
Kontrol		0.944	0.774	0.000*
Dosis I	0.944		0.438	0.000*
Dosis II	0.774	0.438		0.000*
Dosis III	0.000*	0.000*	0.000*	

Keterangan : tanda (*) menyatakan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antar kelompok

- Kontrol dengan dosis I

Tidak ada perbedaan signifikan tebal dinding alveoli kelompok kontrol dengan dosis I. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis I (40mg/Kg BB tikus) tidak mempengaruhi tebal dinding alveoli.

- Kontrol dengan dosis II

Tidak ada perbedaan signifikan tebal dinding alveoli kelompok kontrol dengan dosis I. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis I (200mg/Kg BB tikus) tidak mempengaruhi tebal dinding alveoli.

- Kontrol dengan dosis III

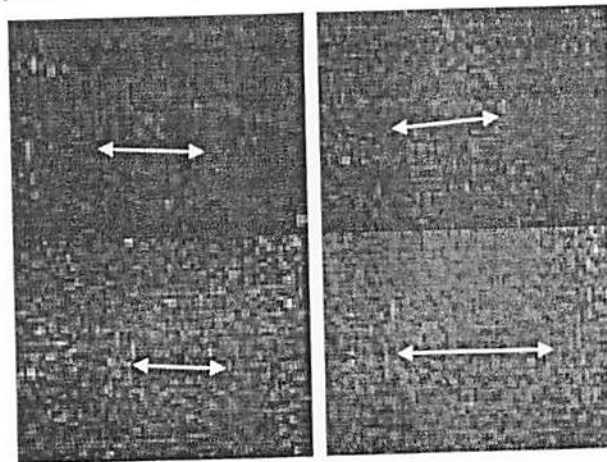
Ada perbedaan signifikan tebal dinding alveoli kelompok kontrol dengan dosis III. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70

% terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis III (1000mg/Kg BB tikus) mempengaruhi tebal dinding alveoli dalam hal ini ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. Gendarussa* meningkatkan tebal dinding alveoli.

5.4.2 Pemeriksaan Histopatologi Limpa Tikus

Pengambilan data dilakukan pada pembesaran 100x dan 400x menggunakan mikroskop *Nikon Eclipse* Salah satu preparat dari Kelompok Kontrol Salah satu preparat dari Kelompok Dosis 1 cahaya biasa merk *E-100* yang dilengkapi dengandigital camera DS Fi2 300 megapixel.

Pengukuran diameter pulpa putih dilakukan menggunakan image raster 3.0. Pengamatan dilakukan pada 10 pulpa yang berbeda. Gambar dari pengukuran diameter pada perbesaran 400x dapat dilihat pada Gambar 5.3 dimana pengukuran diameter ditunjukkan dengan panah berwarna putih.



Salah satu preparat
dari Kelompok Dosis 2

Salah satu preparat
dari Kelompok Dosis 3

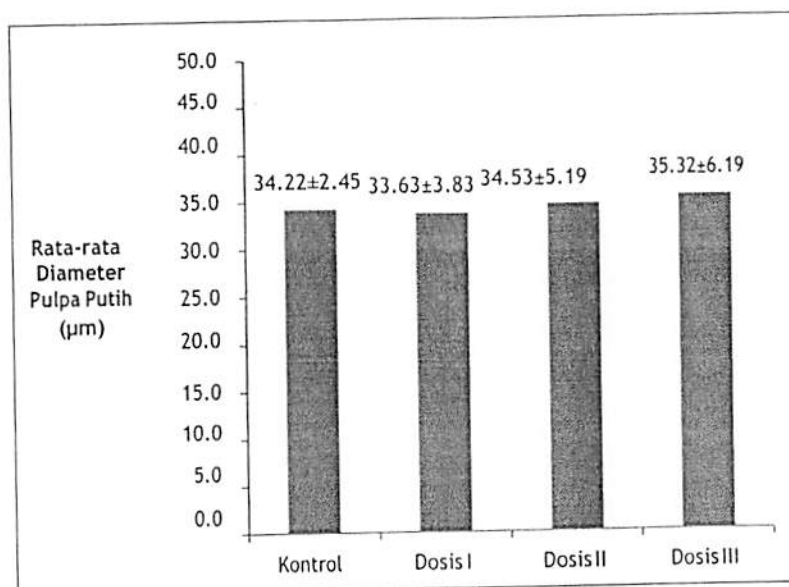
Gambar 5.3 Gambaran histopatologi limpa dengan pewarnaan HE pada perbesaran 400x

Dari pengukuran diameter pulpa putih pada preparat histopatologi limpa tersebut didapat hasil seperti tertera pada Tabel 5.9 dan diagram dari hasil tersebut dapat dilihat pada gambar 5.4.

Tabel 5.9 Hasil pengukuran diameter pulpa putih pada pengamatan preparat histopatologi organ limpa tikus

Kelompok	Rata-Rata Diameter Pulpa Putih (μm)
Kontrol	34.22 ^a ± 2.45
Dosis I	33.63 ^a ± 3.83
Dosis II	34.53 ^a ± 5.19
Dosis III	35.32 ^a ± 6.19

Keterangan : Huruf *superscript* yang sama menyatakan tidak ada perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$) antar kelompok



Gambar 5.4 Diagram batang rata-rata hasil pengukuran diameter pulpa putih

Uji homogenitas dilakukan dengan metode Levene didapatkan *p-values* sebesar 0,08, *p-value* lebih dari 5% maka H_0 diterima artinya data pengukuran diameter pulpa putih memiliki varians residual yang homogen. Lalu uji distribusi menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov didapatkan *p-value* sebesar 0,200 *p-value* lebih besar dari 5% maka H_0 diterima artinya data berdistribusi normal, sehingga dapat dilakukan uji statistik parametrik dengan metode *One-Way* Anova.

Hasil uji *One-Way* Anova didapatkan *p-values* sebesar 0,874 *p-value* lebih dari 5% maka H_0 diterima artinya pemberian ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. Gendarussa*

secara statistik tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perubahan diameter pulpa putih pada limpa tikus.

5.5 Pengamatan Gerak Massa Spermatozoa

Spermatozoa diamati gerak massanya dengan mikroskop perbesaran 100 x dalam satu lapangan pandang.

Tabel 5.10 Presentase hasil pengamatan gerak massa spermatozoa

Kelompok	Gerak Massa Spermatozoa		
	+++	++	+
Kontrol	40%	60%	-
Dosis 1	50%	50%	-
Dosis 2	-	80%	20%
Dosis 3		30%	70%

Keterangan

- ++++ : bila gerak semen membentuk gelombang-gelombang yang besar dan banyak serta cepat
 - ++ : bila gerak semen membentuk gelombang besar sampai sedang tapi jarang
 - +
- : bila gerakan semen membentuk gelombang kecil dan sedikit jumlahnya

Hasil uji Kruskal Wallis didapatkan nilai p-value sebesar 0.000. Jika nilai p-value kurang dari batas kritis atau 5% maka tolak H_0 artinya pemberian ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* memberikan pengaruh yang signifikan terhadap motilitas gerak massa spermatozoa tikus. Dikarenakan hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji U Mann Whitney. Hasil uji U Mann Whitney sebagai berikut.

- Kontrol dengan dosis 1

Didapatkan nilai signifikan sebesar 0.661 artinya H_0 diterima karena p-value lebih dari 5%, tidak ada perbedaan bermakna gerak massa antara kelompok kontrol dengan dosis I. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis I (40mg/Kg BB tikus) tidak mempengaruhi gerak massa spermatozoa.

- Kontrol dengan dosis 2

Didapatkan nilai signifikan sebesar 0.015 artinya H_0 ditolak karena p-value kurang dari 5%, ada perbedaan bermakna gerak massa antara kelompok kontrol dengan dosis II. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis II (200mg/Kg BB tikus) mempengaruhi gerak massa spermatozoa dalam hal ini ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* mampu menurunkan gerak massa .

- Kontrol dengan dosis 3

Didapatkan nilai signifikan sebesar 0.010 artinya tolak H_0 karena p- value kurang dari 5%, ada perbedaan bermakna gerak massa antara kelompok kontrol dengan dosis II. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis II (1000mg/Kg BB tikus) mempengaruhi gerak massa spermatozoa dalam hal ini ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* mampu menurunkan gerak massa.

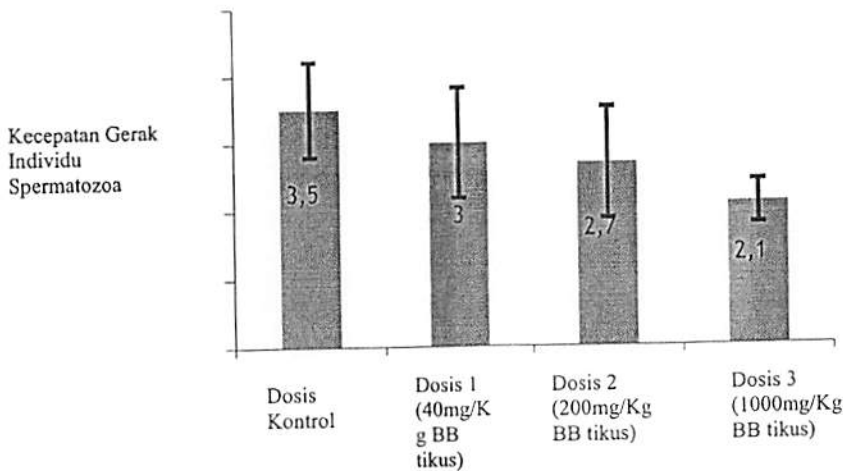
5.6 Pengamatan Gerak Individu Spermatozoa

Spermatozoa diamati gerak kecepatan gerak individunya dengan mikroskop perbesaran 400 x dalam satu lapangan pandang. Keterangan penilaian kecepatan gerak individu spermatozoa

- 0 : tidak ada spermatozoa yang bergerak atau sedikit
- 1 : gerakan spermatozoa pelan
- 2 : gerakan spermatozoa sedang
- 3 : gerakan spermatozoa cepat
- 4 : gerakan spermatozoa sangat cepat

Tabel 5.11 Presentase hasil pengamatan gerak individu spermatozoa

Kelompok	Kecepatan Gerak Individu Spermatozoa				
	0	1	2	3	4
Kontrol	-	-	10%	30%	60%
Dosis 1	-	-	30%	40%	30%
Dosis 2	-	-	50%	30%	20%
Dosis 3	-	-	90%	10%	0%



Grafik 5.1 Diagram rata-rata hasil pengamatan kecepatan gerak individu spermatozoa

Hasil uji Kruskal Wallis didapatkan nilai *P-value* sebesar 0,002, *P-value* kurang dari dari batas kritis atau 5% maka tolak H_0 . Kesimpulannya pemberian ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hasil kecepatan gerak individu spermatozoa. Dalam hal ini kecepatan gerak individu spermatozoa dosis kontrol lebih tinggi dari dosis I, dosis II, dan dosis III. Dosis I mempunyai kecepatan gerak individu spermatozoa lebih tinggi dari dosis II, dan dosis III. Dikarenakan pada uji Kruskal Wallis pemberian ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hasil kecepatan gerak individu spermatozoa maka dilanjutkan uji dengan uji U Mann Whitney. Hasil uji U Mann Whitney sebagai berikut.

- Kontrol dengan dosis 1

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,1988 yang artinya H_0 diterima karena *p*-

value lebih dari 5%. Karena H_0 diterima artinya tidak ada perbedaan signifikan kecepatan gerak individu spermatozoa antara kelompok kontrol dengan dosis I. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis I (40mg/Kg BB tikus) tidak mempengaruhi kecepatan gerak individu spermatozoa.

- Kontrol dengan dosis 2

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,0539 yang artinya H_0 diterima karena p-value lebih dari 5%. Karena H_0 diterima artinya tidak ada perbedaan signifikan kecepatan gerak individu spermatozoa antara kelompok kontrol dengan dosis II. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis II (200mg/Kg BB tikus) tidak mempengaruhi kecepatan gerak individu spermatozoa.

- Kontrol dengan dosis 3

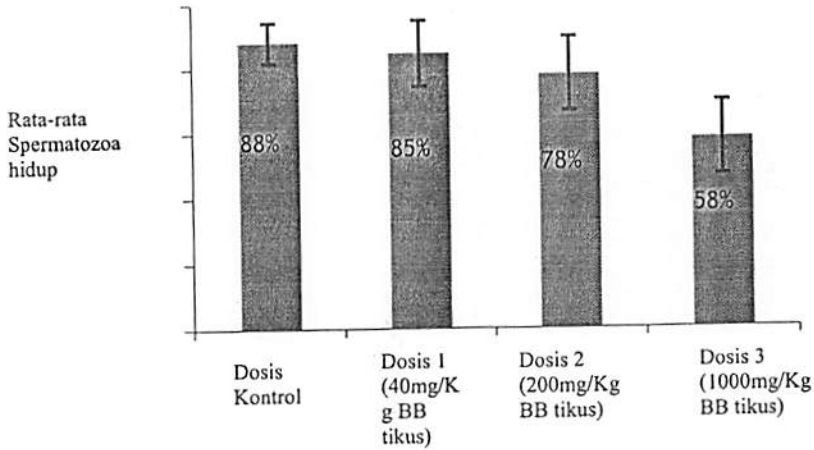
Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,0013 yang artinya H_0 ditolak karena p-value kurang dari 5%. Karena H_0 ditolak artinya tidak ada perbedaan signifikan kecepatan gerak individu spermatozoa antara kelompok kontrol dengan dosis III. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis III (1000mg/Kg BB tikus) mempengaruhi kecepatan gerak individu spermatozoa dalam hal ini ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis 1000mg/Kg BB tikus menurunkan kecepatan gerak spermatozoa.

5.7 Pemeriksaan Viabilitas Spermatozoa

Diamati 200 spermatozoa dan dihitung presentase spermatozoa hidup, berikut hasil yang didapat

Tabel 5.12 Rata-rata presentase spermatozoa hidup

Viabilitas Hidup				
Rata-rata SD	Kontrol	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
	88±6,3%	84±10%	78±11%	58±11%



Grafik 5.2. Diagram rerata hasil pemeriksaan presentase spermatozoa hidup.

Uji homogenitas dilakukan dengan metode Levene didapatkan p -value sebesar 0,038, p -value kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya data presentase spermatozoa hidup memiliki varians residual tidak homogen. Lalu uji distribusi menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov didapatkan p -value sebesar 0,01 p -value kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya data berdistribusi tidak normal, sehingga tidak dapat dilakukan uji statistik parametrik maka data diuji dengan statistik non-parametrik dengan uji Kruskal Wallis.

Hasil uji Kruskal Wallis didapatkan p -value sebesar 0,000, p -value kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya pemberian ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* memberikan pengaruh yang signifikan terhadap presentase spermatozoa hidup. Dikarenakan hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan uji U Mann Whitney. Hasil uji U Mann Whitney sebagai berikut.

- Kontrol dengan dosis 1

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,7055 yang artinya H_0 diterima karena p -value lebih dari 5%. Karena H_0 diterima artinya tidak ada perbedaan signifikan presentase spermatozoa hidup antara kelompok kontrol dengan dosis I. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis I (40mg/Kg BB tikus) tidak mempengaruhi presentase spermatozoa hidup.

- Kontrol dengan dosis 2

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,0640 yang artinya H_0 diterima karena p -value lebih dari 5%. Karena H_0 diterima artinya tidak ada perbedaan signifikan presentase spermatozoa hidup antara kelompok kontrol dengan dosis II. Dapat

disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis II (200mg/Kg BB tikus) tidak mempengaruhi presentase spermatozoa hidup.

- Kontrol dengan dosis 3

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,0003 yang artinya H_0 ditolak karena *p*-value kurang dari 5%. Karena H_0 ditolak artinya ada perbedaan signifikan presentase spermatozoa hidup antara kelompok kontrol dengan dosis III. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis III (1000mg/Kg BB tikus) mempengaruhi presentase spermatozoa hidup dalam hal ini ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* dosis 1000mg/Kg BB tikus menurunkan presentase spermatozoa hidup .

5.8 Pengukuran Konsentrasi Spermatozoa

Hasil perhitungan konsentrasi spermatozoa secara langsung menggunakan kotak hitung (*Improved Neubauer*) adalah sebagai berikut.

Uji homogenitas dilakukan dengan metode Levene didapatkan *p*-value sebesar 0,000 *p*-value kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya data hasil perhitungan konsentrasi spermatozoa memiliki varians residual tidak homogen. Lalu uji distribusi menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov didapatkan *p*-value sebesar 0,07 *p*-value kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya data berdistribusi tidak normal, sehingga tidak dapat dilakukan uji statistik parametrik maka data diuji dengan statistik non-parametrik dengan uji Kruskal Wallis.

Hasil uji Kruskal Wallis didapatkan *p*-value sebesar 0,000, *p*-value kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya pemberian ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* memberikan pengaruh yang signifikan terhadap konsentrasi spermatozoa. Dikarenakan hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan uji U Mann Whitney. Hasil uji U Mann Whitney sebagai berikut,

- Kontrol dengan dosis 1

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,028 yang artinya H_0 ditolak karena *p*-value kurang dari 5%. Karena H_0 ditolak artinya ada perbedaan signifikan konsentrasi spermatozoa kelompok kontrol dengan dosis I. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis I (40mg/Kg BB tikus) mempengaruhi presentase spermatozoa dalam hal ini menurunkan konsentrasi spermatozoa.

- Kontrol dengan dosis 2

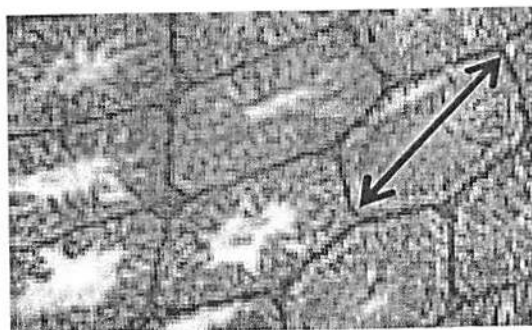
Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,002 yang artinya H_0 ditolak karena p-value kurang dari 5%. Karena H_0 ditolak artinya ada perbedaan signifikan konsentrasi spermatozoa kelompok kontrol dengan dosis II. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis II (200mg/Kg BB tikus) mempengaruhi presentase spermatozoa menurunkan konsentrasi spermatozoa.

- Kontrol dengan dosis 3

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,015 yang artinya H_0 ditolak karena p-value kurang dari 5%. Karena H_0 ditolak artinya ada perbedaan signifikan konsentrasi spermatozoa kelompok kontrol dengan dosis II. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis III (1000mg/Kg BB tikus) mempengaruhi presentase spermatozoa menurunkan konsentrasi spermatozoa.

5.9 Pengukuran Diameter Tubulus

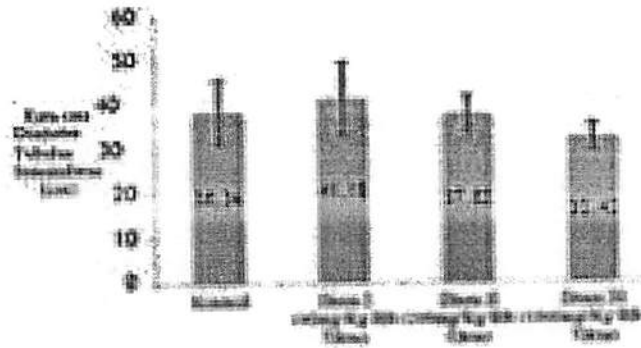
Pengambilan data dilakukan pada pembesaran 100x menggunakan mikroskop cahaya biasa merk Nikon Eclipse E-100 yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel. Pengukuran diameter tubulus seminiferus dilakukan pada tubulus seminiferus yang berbentuk bulat. Kemudian dilakukan pengukuran diameter tubulus seminiferus. Pengukuran dilakukan pada 10 tubulus seminiferus yang berbeda.



Gambar 5.5 Pengukuran diameter tubulus seminiferus pada preparat histologi pewarnaan HE perbesaran 100 X

Tabel 5.13 Rata-rata hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus

	Kontrol	Dosis I	Dosis II	Dosis III
Rata-rata ± SD	38,34 ± 7,29	41,17 ± 8,09	37,82 ± 8,80	32,47 ± 9,09



Grafik 5.5. Diagram rata-rata hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus

Uji homogenitas dilakukan dengan metode Levene didapatkan *p-value* sebesar 0,261, *p-value* lebih dari 5% maka H_0 diterima artinya data pengukuran diameter tubulus seminiferus memiliki varians residual yang homogen. Lalu uji distribusi menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov didapatkan *p-value* sebesar 0,01 *p-value* kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya data berdistribusi tidak normal, sehingga tidak dapat dilakukan uji statistik parametrik maka data diuji dengan statistik non-parametrik dengan uji Kruskal Wallis.

Hasil uji Kruskal Wallis didapatkan *p-value* sebesar 0,0004, *p-value* kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya pemberian ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perubahan diameter tubulus seminiferus. Dikarenakan hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan uji U Mann Whitney. Hasil uji U Mann Whitney sebagai berikut,

- Kontrol dengan dosis I

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,3447 yang artinya H_0 diterima karena *p-value* kurang dari 5%. Karena H_0 diterima artinya tidak ada perbedaan signifikan diameter tubulus seminiferus kelompok kontrol dengan dosis I. Dapat

disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis I (40mg/Kg BB tikus) tidak mempengaruhi diameter tubulus seminiferus.

- Kontrol dengan dosis 2

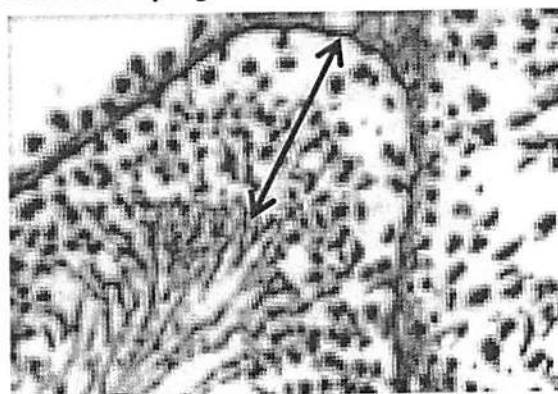
Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,3447 yang artinya H_0 diterima karena p-value kurang dari 5%. Karena H_0 diterima artinya tidak ada perbedaan signifikan diameter tubulus seminiferus kelompok kontrol dengan dosis II. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis II (200mg/Kg BB tikus) tidak mempengaruhi diameter tubulus seminiferus.

- Kontrol dengan dosis 3

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,0073 yang artinya H_0 ditolak karena p-value kurang dari 5%. Karena H_0 ditolak artinya ada perbedaan signifikan diameter tubulus seminiferus kelompok kontrol dengan dosis III. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis III (1000mg/Kg BB tikus) mempengaruhi diameter tubulus seminiferus dalam hal ini ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* menurunkan diameter tubulus seminiferus.

5.10 Pengukuran Tebal Tubulus Seminiferus

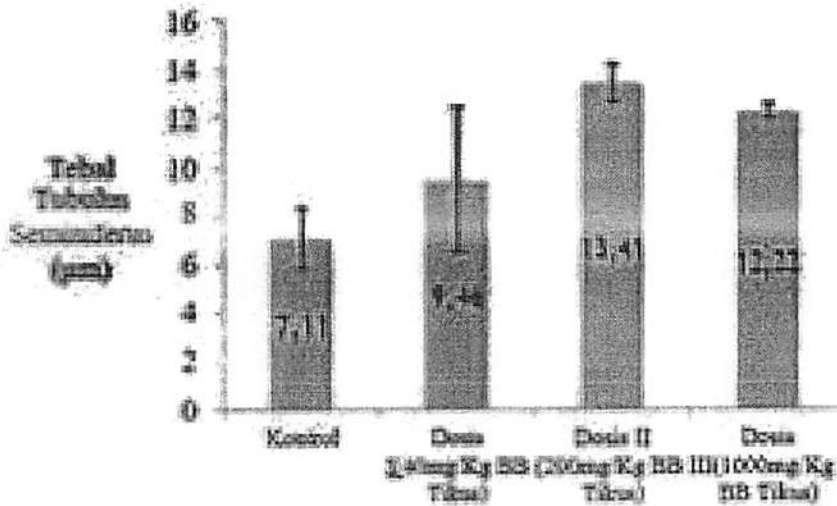
Pengambilan data dilakukan pada pembesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon Eclipse E-100* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel. Pengukuran tebal tubulus seminiferus dilakukan dengan cara mengukur jarak terdekat antara membran basalis dan sel spermatogenik ke lumen tubulus. Pengukuran dilakukan pada 10 tubulus seminiferus yang berbeda



Gambar 5.5 Pengukuran tebal tubulus seminiferus pada preparat histologi pewarnaan HE perbesaran 400 X

Tabel 5.14 Rata-Rata hasil pengukuran tebal tubulus seminiferus

Tebal Tubulus Seminiferus				
	Kontrol	Dosis I	Dosis II	Dosis III
Rata-rata±SD	7,11±1,25	9,48±2,94	13,41±0,78	11,22±0,29



Grafik 5.6 Diagram rata-rata hasil pengukuran tebal tubulus seminiferus

Uji homogenitas dilakukan dengan metode Levene didapatkan *p-value* sebesar 0,000, *p-value* kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya data hasil pengukuran tebal tubulus seminiferus memiliki varians residual tidak homogen. Lalu uji distribusi menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov didapatkan *p-value* sebesar 0,010 *p-value* kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya data berdistribusi tidak normal, sehingga tidak dapat dilakukan uji statistik parametrik maka data diuji dengan statistik non-parametrik dengan uji Kruskal Wallis.

Hasil uji Kruskal Wallis didapatkan *p-value* sebesar 0,000, *p-value* kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya pemberian ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perubahan tebal tubulus seminiferus. Dikarenakan hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan uji U Mann Whitney. Hasil uji U Mann Whitney sebagai berikut.

- Kontrol dengan dosis 1

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,1041 yang artinya H_0 diterima karena p-value kurang dari 5%. Karena H_0 diterima artinya tidak ada perbedaan signifikan diameter tubulus seminiferus kelompok kontrol dengan dosis I. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis I (40mg/Kg BB tikus) tidak mempengaruhi tebal tubulus seminiferus.

- Kontrol dengan dosis 2

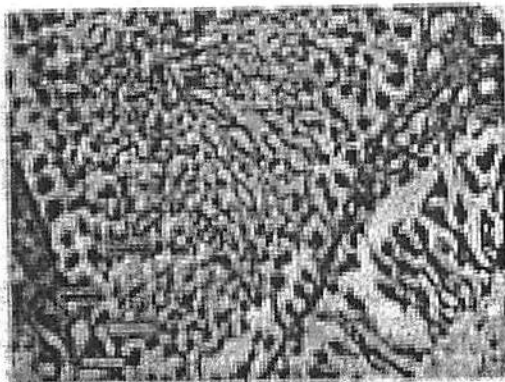
Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,0002 yang artinya H_0 ditolak karena p-value kurang dari 5%. Karena H_0 ditolak artinya ada perbedaan signifikan diameter tubulus seminiferus kelompok kontrol dengan dosis II. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis II (200mg/Kg BB tikus) mempengaruhi tebal tubulus seminiferus dalam hal ini ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* meningkatkan tebal tubulus seminiferus.

- Kontrol dengan dosis 3

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,0002 yang artinya H_0 ditolak karena p-value kurang dari 5%. Karena H_0 ditolak artinya ada perbedaan signifikan diameter tubulus seminiferus kelompok kontrol dengan dosis III. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis III (1000mg/Kg BB tikus) mempengaruhi tebal tubulus seminiferus dalam hal ini ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* meningkatkan tebal tubulus seminiferus.

5.11 Perhitungan Sel Spermatogenik

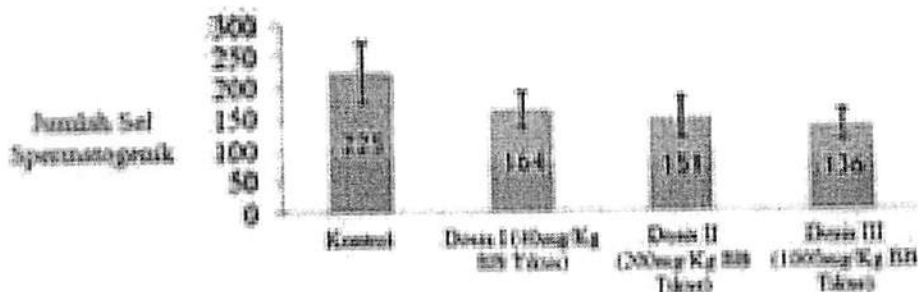
Pengambilan data dilakukan pada pembesaran 100x menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon Eclipse E-100* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel. Sel spermatogonik (spermatogonium, spermatosid, spermatid dan spermatozoa) dihitung pada masing pada 5 tubulus yang dipilih acak seminiferus dengan kriteria tubulus seminiferus berbentuk bulat dan memenuhi lapang pandang minimal 80%.



Gambar 5.7 Perhitungan jumlah sel spermatogenik (panah putih sel spermatogonium, panah kuning sel spermatosid, panah merah spermatid, panah hitam sel sertoli) pada preparat histologi pewarnaan HE perbesaran 400 X.

Tabel 5.15 Hasil perhitungan sel spermatogenik

Kategori	Jumlah Sel Spermatogenik			
	Kontrol	Dosis I	Dosis II	Dosis III
Erutan 5D	225±48	164±28	151±33	136±25



Grafik 5.7 Diagram rata-rata hasil perhitungan jumlah sel spermatogenik

Uji homogenitas dilakukan dengan metode Levene didapatkan *p-value* sebesar 0,113 , *p-value* lebih dari 5% maka H_0 diterima artinya data hasil perhitungan sel spermatogenik memiliki varians residual homogen. Lalu uji distribusi menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov didapatkan *p-value* sebesar 0,992 , *p-value* lebih dari 5% maka H_0 diterima artinya data berdistribusi normal, sehingga dapat dilakukan uji statistik parametrik.

Hasil uji Anova didapatkan *p-value* sebesar 0,000, *p-value* kurang dari 5% maka H_0 ditolak artinya pemberian ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perubahan jumlah sel spermatogenik. Dikarenakan hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan

uji LSD. Hasil uji LSD sebagai berikut,

- Kontrol dengan dosis 1

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,000 yang artinya H_0 ditolak karena p-value kurang dari 5%. Karena H_0 ditolak artinya ada perbedaan signifikan diameter tubulus seminiferus kelompok kontrol dengan dosis I. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis I (40mg/Kg BB tikus) menurunkan jumlah sel spermatogeik.

- Kontrol dengan dosis 2

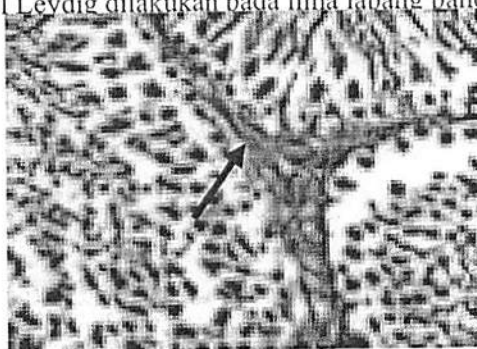
Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,000 yang artinya H_0 ditolak karena p-value kurang dari 5%. Karena H_0 ditolak artinya ada perbedaan signifikan diameter tubulus seminiferus kelompok kontrol dengan dosis II. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis II (200mg/Kg BB tikus) menurunkan jumlah sel spermatogeik.

- Kontrol dengan dosis 3

Didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,000 yang artinya H_0 ditolak karena p-value kurang dari 5%. Karena H_0 ditolak artinya ada perbedaan signifikan diameter tubulus seminiferus kelompok kontrol dengan dosis II. Dapat disimpulkan ekstrak etanol 70 % terfraksinasi daun *J. gendarussa* pada dosis II (1000mg/Kg BB tikus) menurunkan jumlah sel spermatogeik.

5.12 Perhitungan Sel Leydig

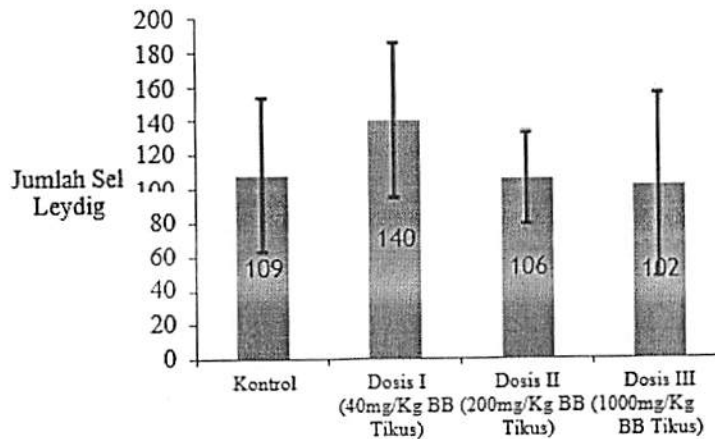
Pengambilan data dilakukan pada pembesaran 400x menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon Eclipse E-100* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel. Penghitungan sel Leydig dilakukan pada lima lapangan pandang yang berbeda.



Gambar 5.7 Perhitungan jumlah sel Leydig pada preparat histologi pewarnaan HE perbesaran 400 X

Tabel 5.16 Rata-rata hasil perhitungan sel Leydig

		Jumlah Sel Leydig			
		Kontrol	Dosis I	Dosis II	Dosis III
Rerata	SD	109±43	140±43	106±27	102±34



Grafik 5.8 Diagram batang rata-rata hasil perhitungan jumlah Sel Leydig

Uji homogenitas dilakukan dengan metode Levene didapatkan *p-value* sebesar 0,992, *p-value* lebih dari 5% maka H_0 diterima artinya data hasil perhitungan sel Leydig memiliki varians residual homogen. Lalu uji distribusi menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov didapatkan *p-value* sebesar 0,680 *p-value* lebih dari 5% maka H_0 diterima artinya data berdistribusi normal.

Hasil uji Anova didapatkan *p-value* sebesar 0,220, *p-value* lebih dari 5% maka H_0 diterima artinya pemberian ekstrak etanol 70% terfraksinasi daun *J. gendarussa* tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah sel Leydig.

BAB 6. RENCANA TAHAP BERIKUTNYA

Tahap penelitian berikutnya adalah melengkapi data LCMS/MS organ hati, jantung limpa, usus, testis dan paru tikus dengan metode yang sama seperti pada organ ginjal.



BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Pengamatan studi toksisitas akut dihasilkan bahwa dosis maksimal menunjukkan katagori praktis tidak toksik.
2. Dari studi toksisitas subkronik, organ hati ginjal, paru, jantung, limpa, usus dan testis hasil pengamatan histologi tetap menunjukkan jaringan normal.
3. Hasil sementara analisis LCMS/MS tidak ada residu gendarusin A pada organ ginjal.

Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka bisa dilanjutkan untuk penetapan dosis pada implementasi di manusia. Hal ini dapat direkomendasikan untuk dilanjutkan uji klinis.



LAMPIRAN

HASIL PEMERIKSAAN HISTOPATOLOGI

Nama Pemilik : Prof Bambang
Instansi :
Alamat :
Telepon :
Sediaan : Testis
Pewarnaan : HE
Waktu Pemeriksaan :
Pemeriksa : Djoko Legowo, MKes., drh

Metode Pemeriksaan

Pemeriksaan ini dimaksudkan untuk perubahan histopatologi pada organ. Pengambilan data dilakukan pada pembesaran 100x dan 400x menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon Eclipse E-100* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel.

Pengukuran diameter tubulus seminiferus dilakukan pada tubulus seminiferus yang berbentuk bulat. Kemudian dilakukan pengukuran diameter tubulus seminiferus. Pengamatan dilakukan pada 10 tubulus seminiferus yang berbeda.

Pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus dilakukan dengan cara mengukur jarak terdekat antara membran basalis dan sel spermatogenik ke lumen tubulus.

Surabaya,
Pemeriksa,

(Djoko Legowo, Mkes., drh)
NIP. 196712141996031001



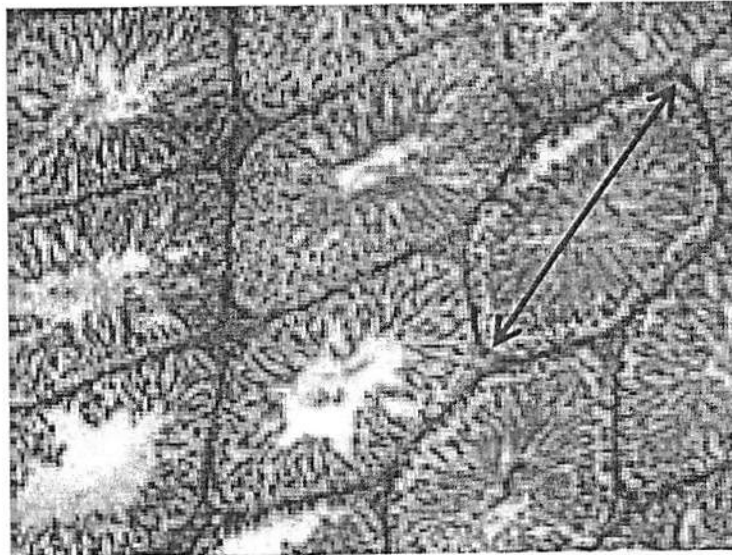
Diameter Tubulus Seminiferus

Kelompok	Diameter Tubulus Seminiferus	Keterangan
K-1	32,62674	
K-2	36,44887	
K-3	35,10797	
K-4	33,53198	
K-5	44,38435	
K-6	32,93516	
K-7	41,81177	
K-8	55,14009	
K-9	38,06499	
K-10	33,58297	
Rata-rata	38,36349	

Kelompok	Diameter Tubulus Seminiferus	Keterangan
P1-1	34,10894	
P1-2	36,11388	
P1-3	49,41053	
P1-4	40,92704	
P1-5	36,60939	
P1-6	40,61113	
P1-7	37,80739	
P1-7	47,13438	
P1-9	31,27707	
P1-10	57,52911	
Rata-rata	41,15289	

Kelompok	Diameter Tubulus Seminiferus	Keterangan
P2-1	34,10894	
P2-2	36,11388	
P2-3	49,41053	
P2-4	40,92704	
P2-5	36,60939	
P2-6	40,61113	
P2-7	37,80739	
P2-7	47,13438	
P2-9	31,27707	
P2-10	57,52911	
Rata-rata	37,81825	

Kelompok	Diameter Tubulus Seminiferus	Keterangan
P3-1	30,85954	
P3-2	32,59566	
P3-3	37,38428	
P3-4	33,46675	
P3-5	38,00314	
P3-6	30,24102	
P3-7	30,88941	
P3-7	30,74255	
P3-9	28,89073	
P3-10	31,07724	
Rata-rata	32,41503	



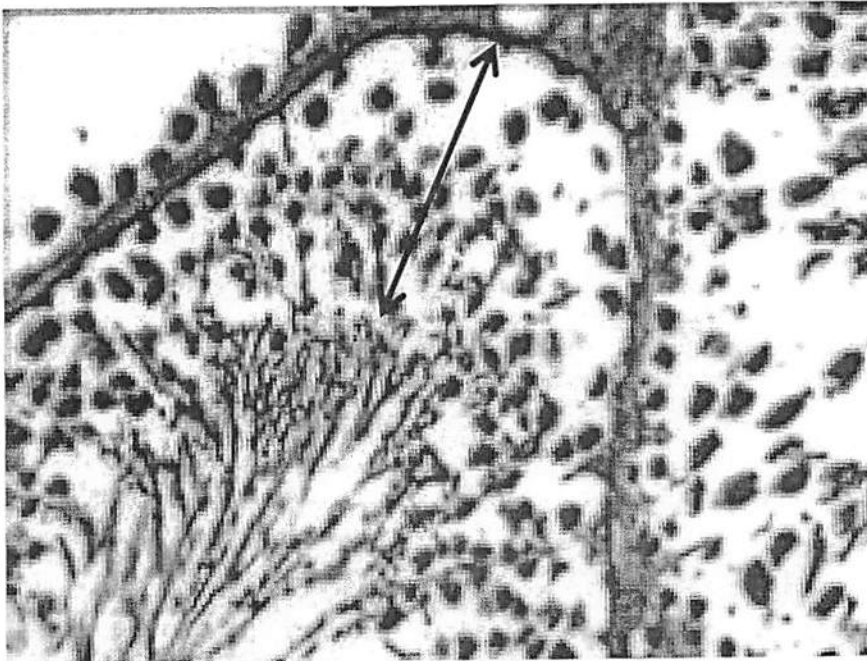
EPITEL TUBULUS

Kelompok	Diameter Epitel tubulus	Keterangan
K-1	7,042142	
K-2	6,843011	
K-3	6,336115	
K-4	7,427166	
K-5	6,122032	
K-6	6,30846	
K-7	7,240428	
K-8	8,231049	
K-9	5,595712	
K-10	9,942339	
Rata-rata	7,108845	

Kelompok	Diameter Epitel Tubulus	Keterangan
P1-1	6,744427	
P1-2	6,975865	
P1-3	6,579406	
P1-4	10,348234	
P1-5	6,083035	
P1-6	9,40183	
P1-7	9,557109	
P1-7	13,533277	
P1-9	14,440721	
P1-10	10,944836	
Rata-rata	9,460874	

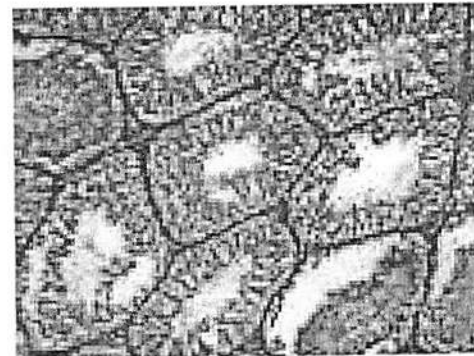
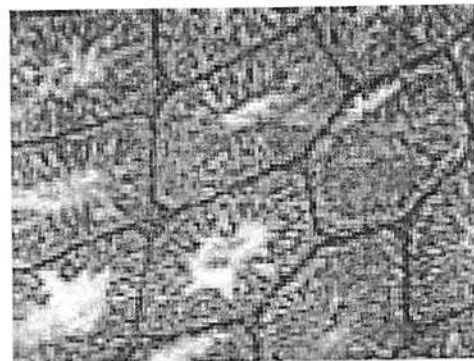
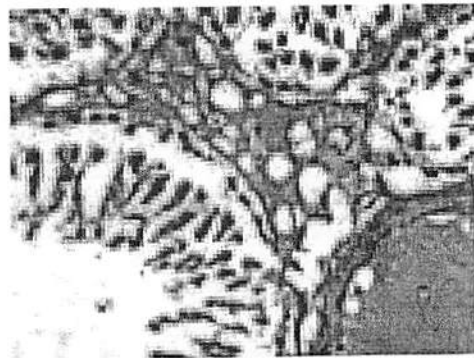
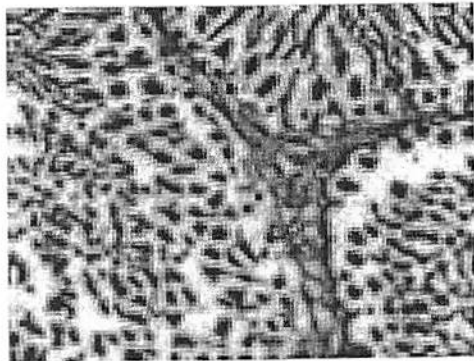
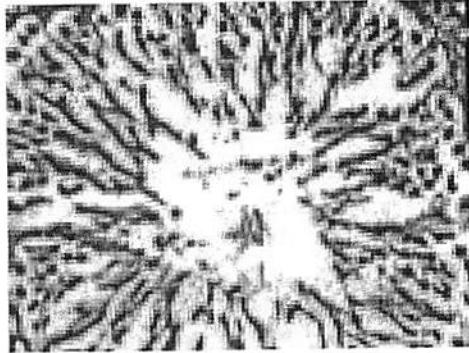
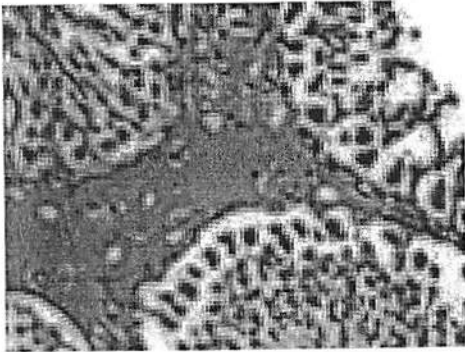
Kelompok	Diameter Epitel Tubulus	Keterangan
P2-1	13,297662	
P2-2	13,7407182	
P2-3	13,8784165	
P2-4	14,4661806	
P2-5	14,4154032	
P2-6	13,6957157	
P2-7	13,2688907	
P2-7	12,6899282	
P2-9	12,4129532	
P2-10	12,2232782	
Rata-rata	11,25316	

Kelompok	Diameter Tubulus Seminiferus	Keterangan
P3-1	12,12427	
P3-2	12,240307	
P3-3	12,3009109	
P3-4	12,510901	
P3-5	12,5660137	
P3-6	12,5756585	
P3-7	12,3113349	
P3-7	12,0268019	
P3-9	11,9011024	
P3-10	11,6850365	
Rata-rata	11,12284	

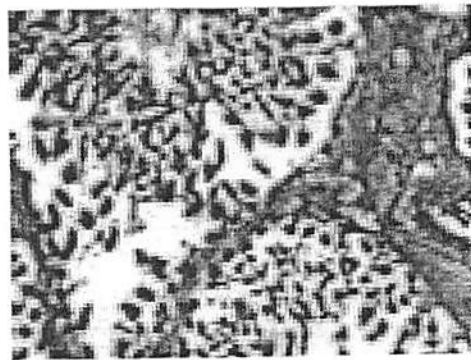
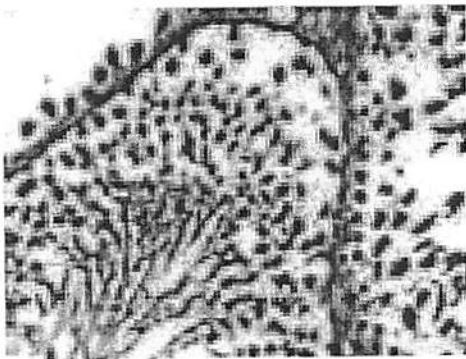
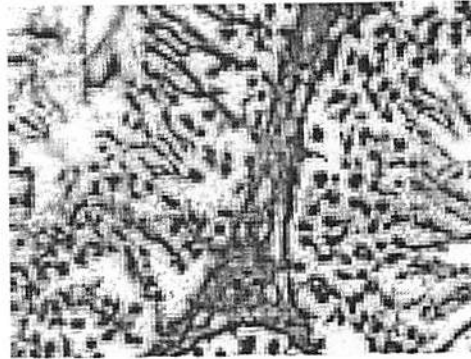
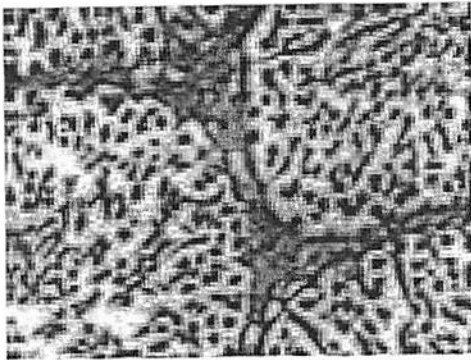
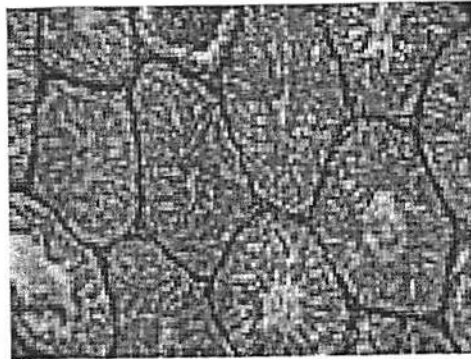
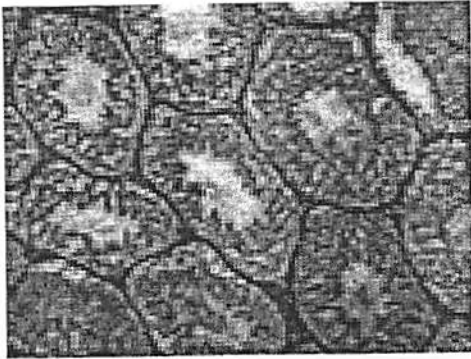


Organ testis

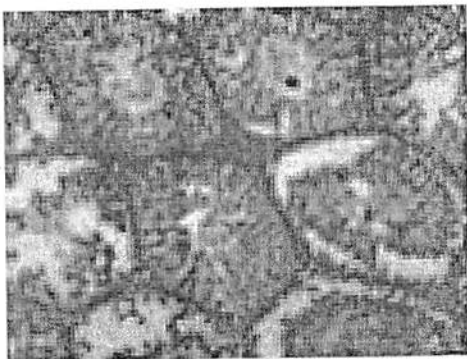
K 1

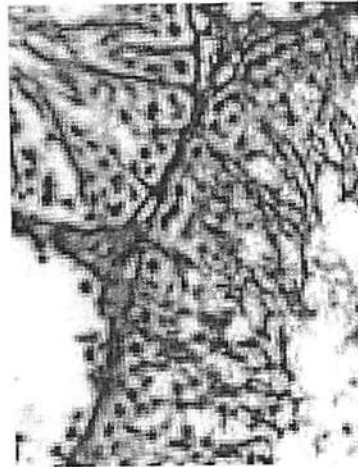
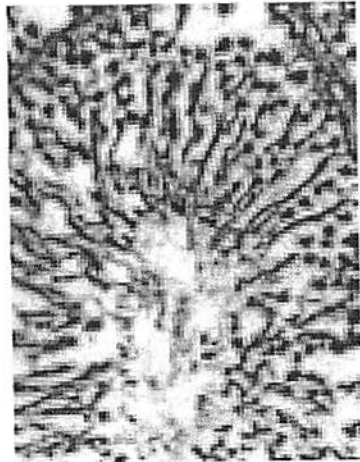


K 2

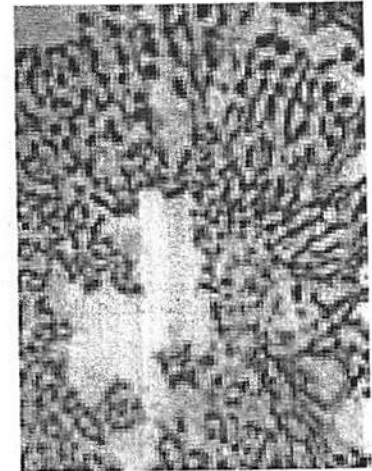
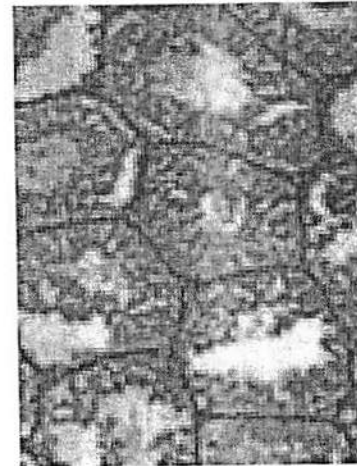
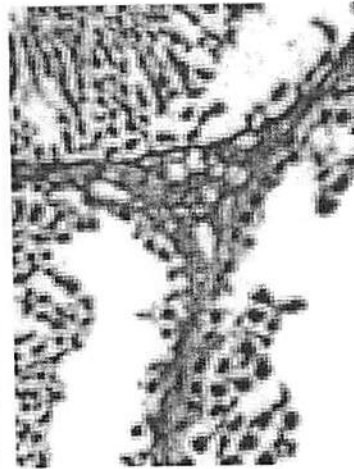
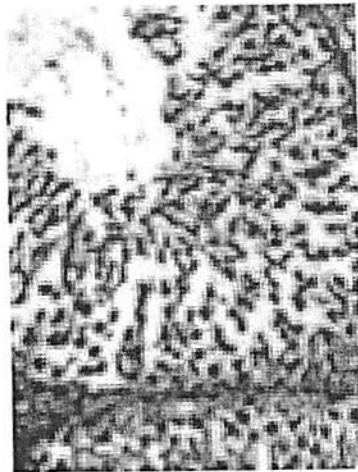
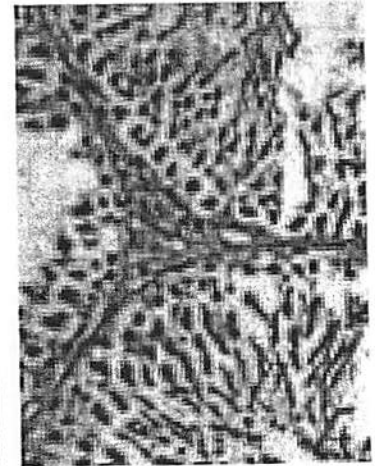


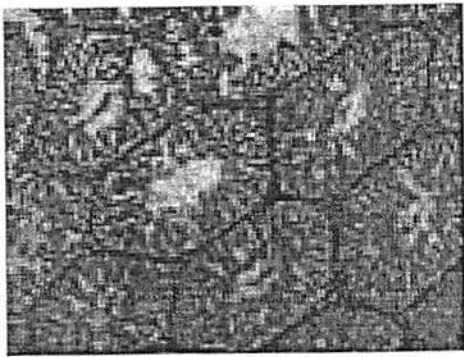
K 3



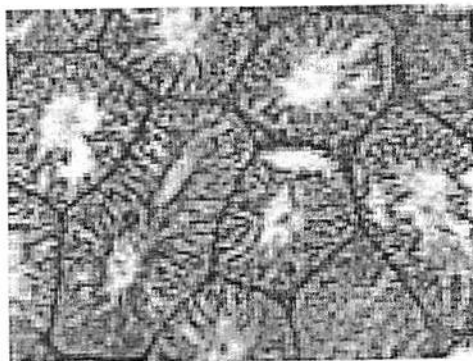
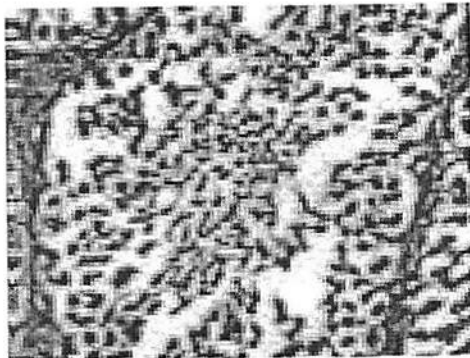
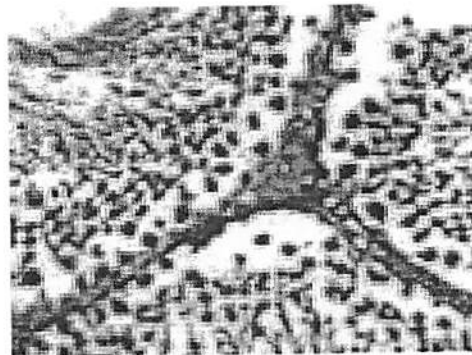
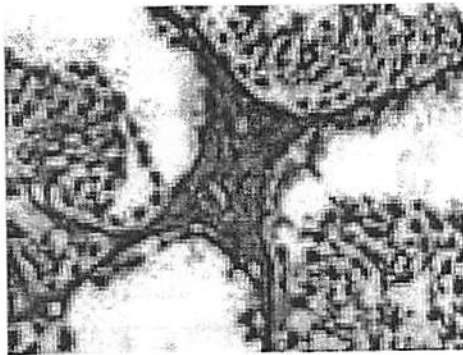


K 4

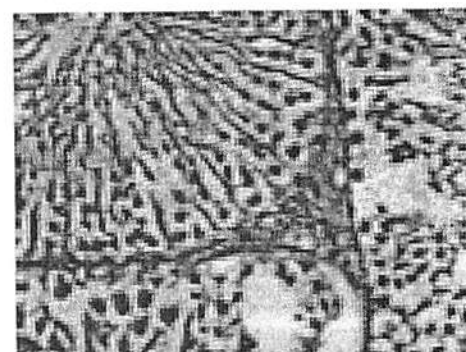
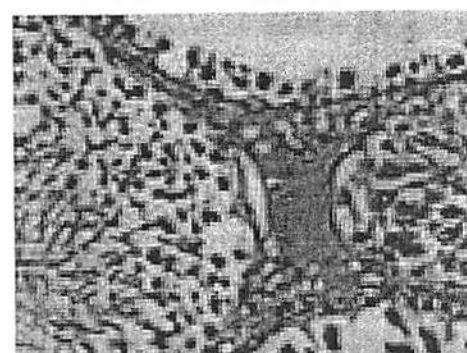
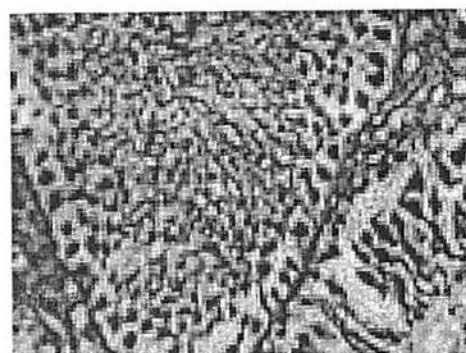
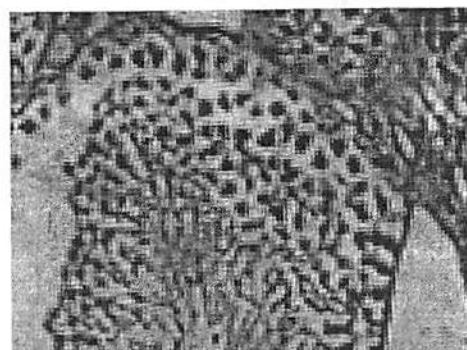




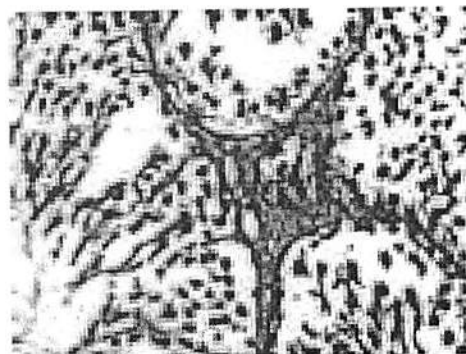
K 5

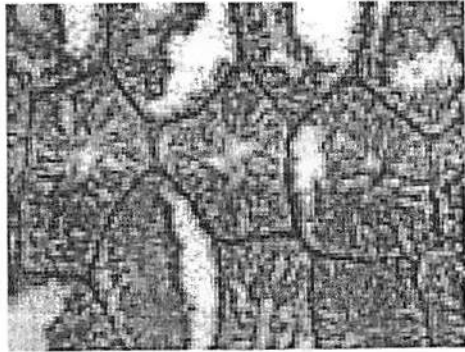
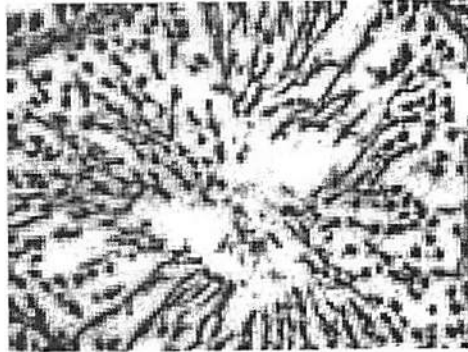


K 6

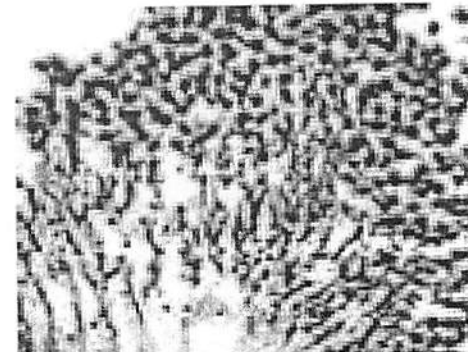
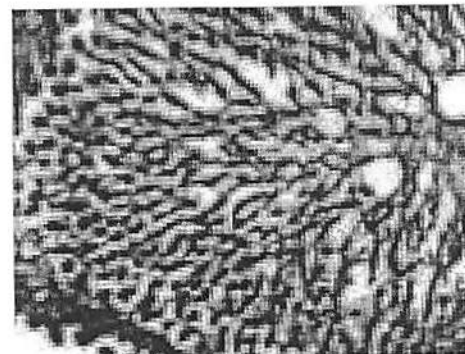
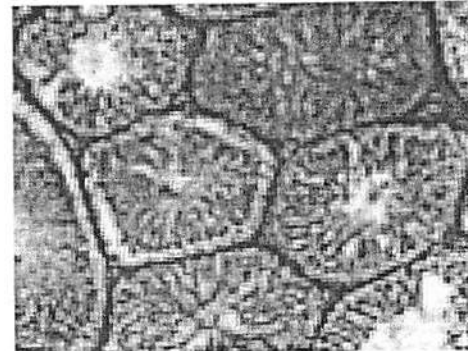
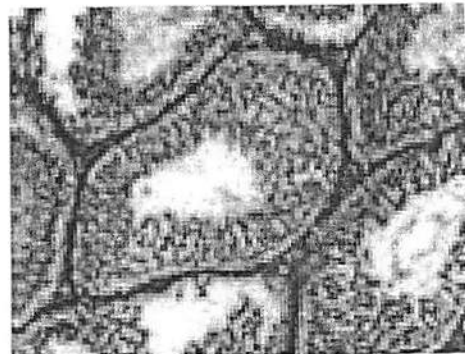


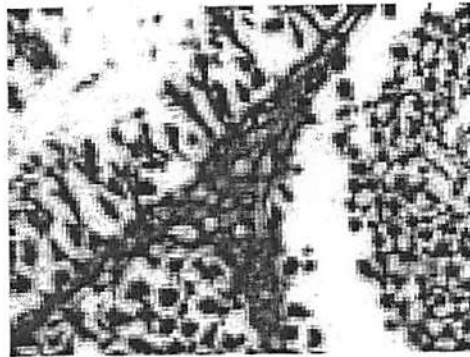
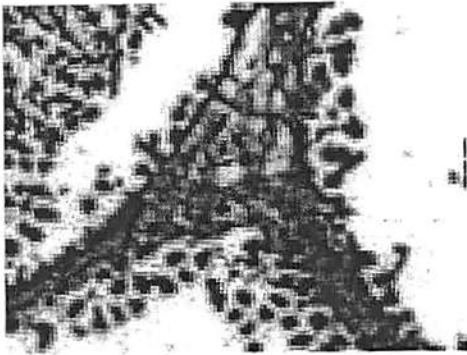
K 7



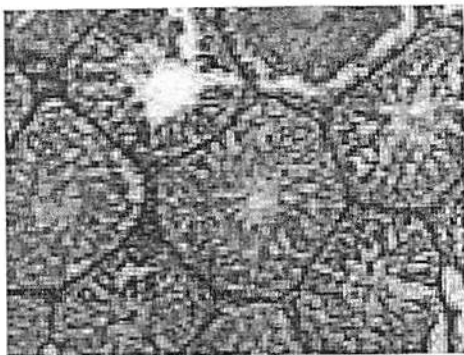
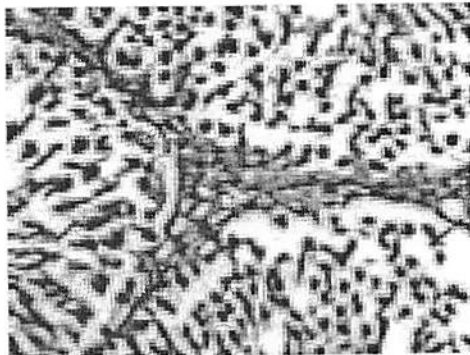
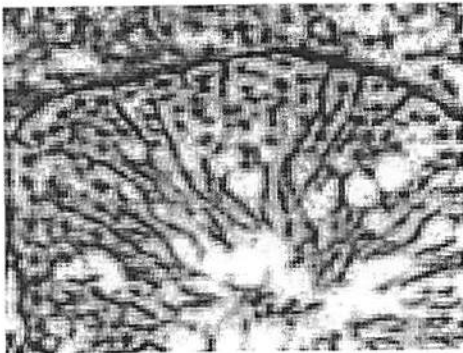


K 8

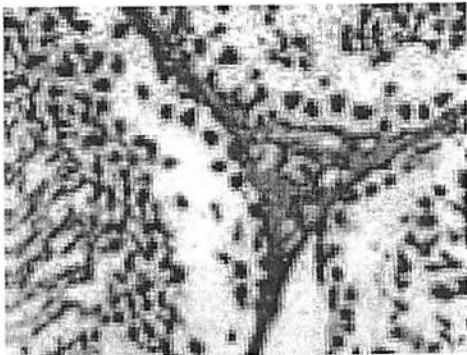
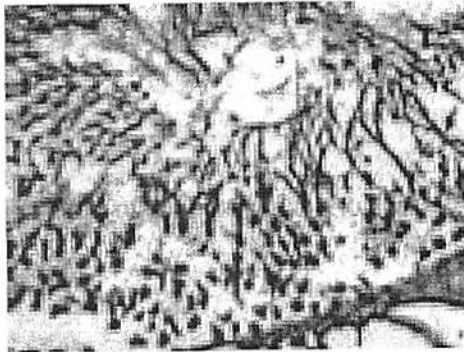
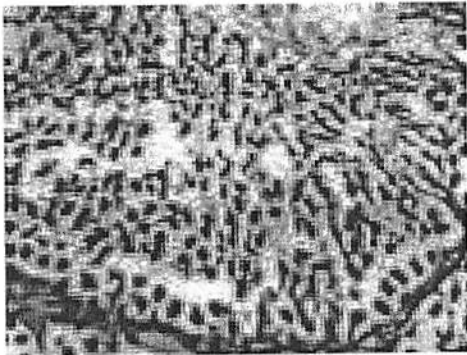
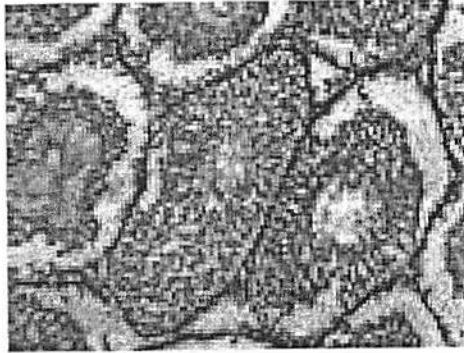




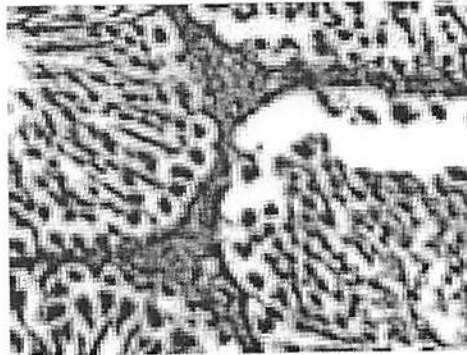
K 9

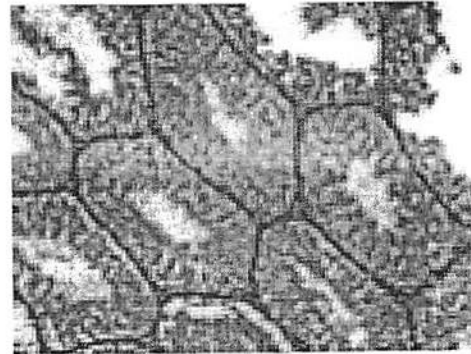
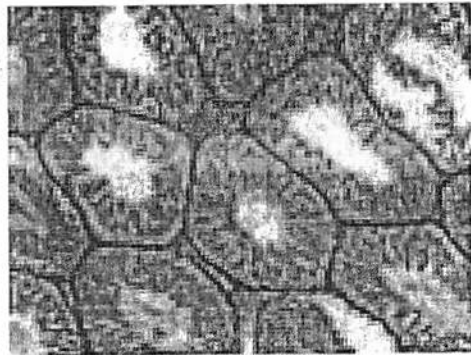
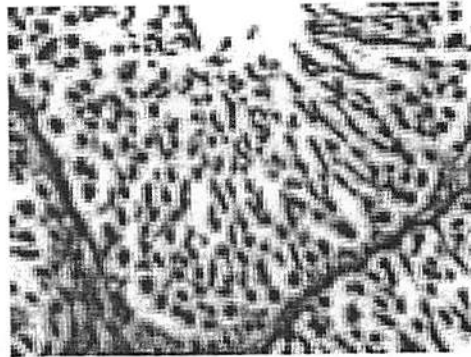
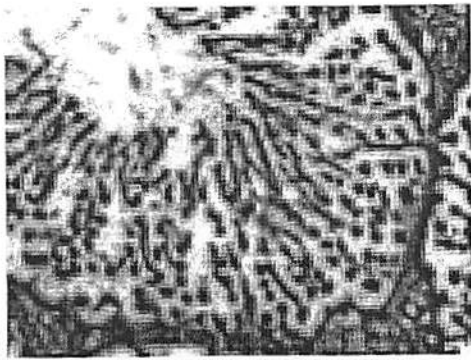


K 10

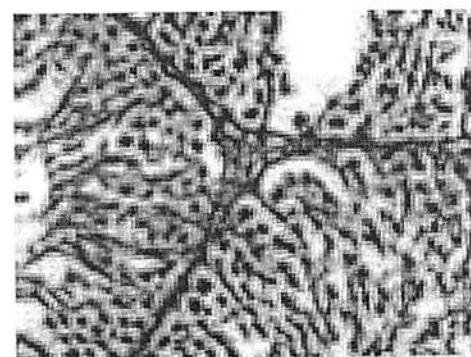
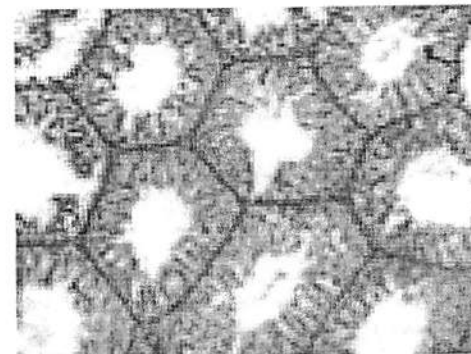


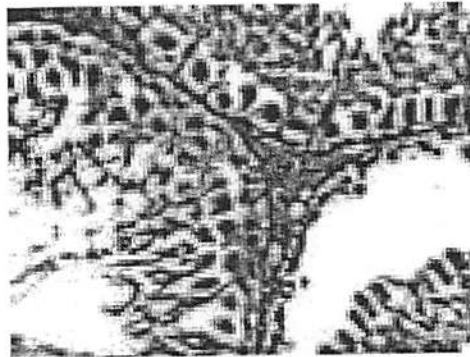
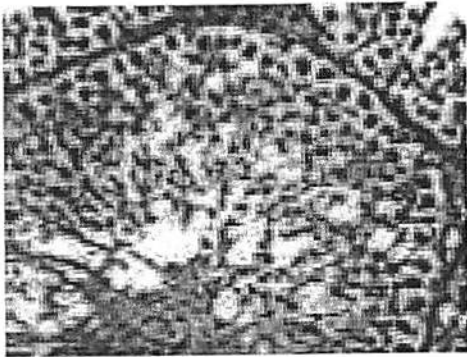
P 1-1



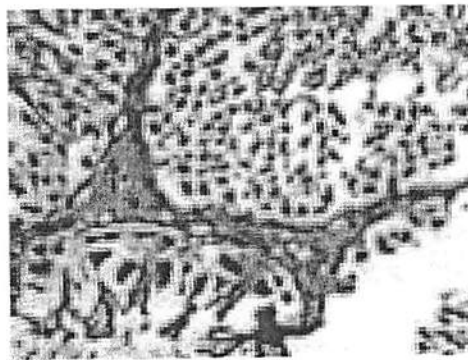
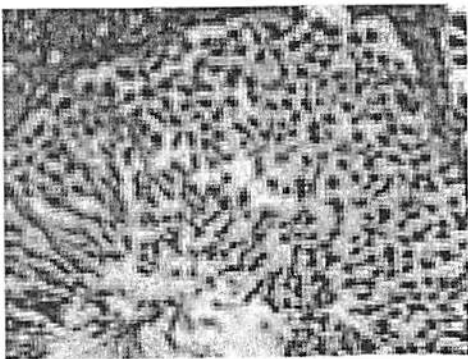
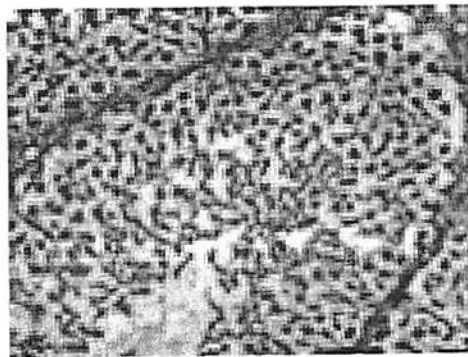
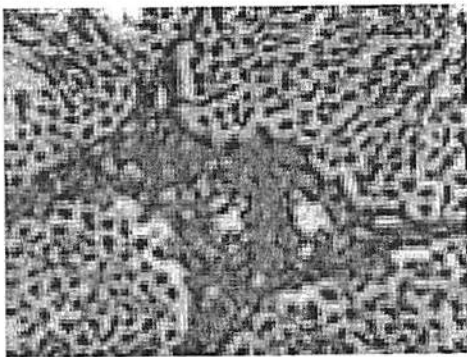


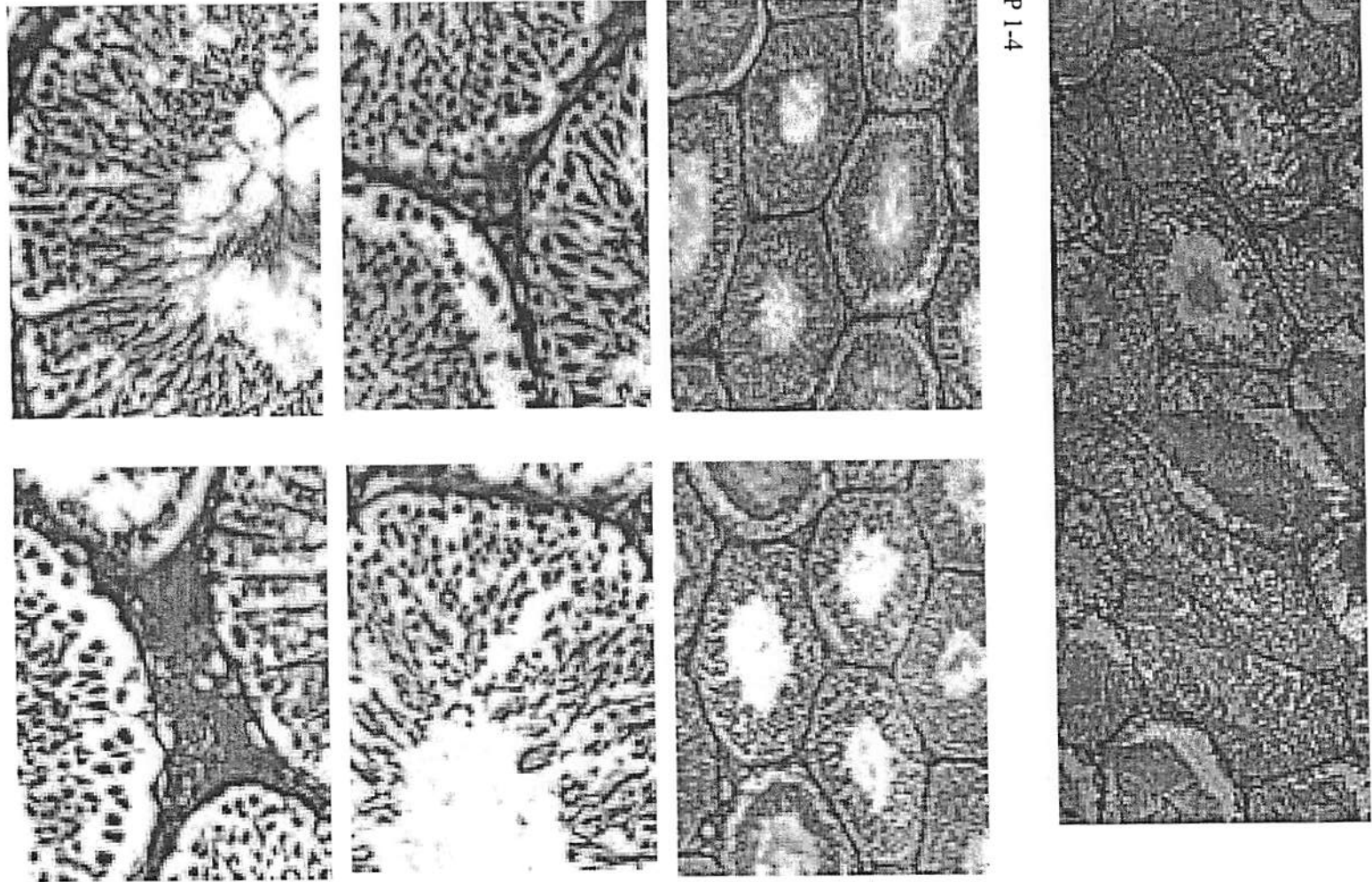
P 1-2



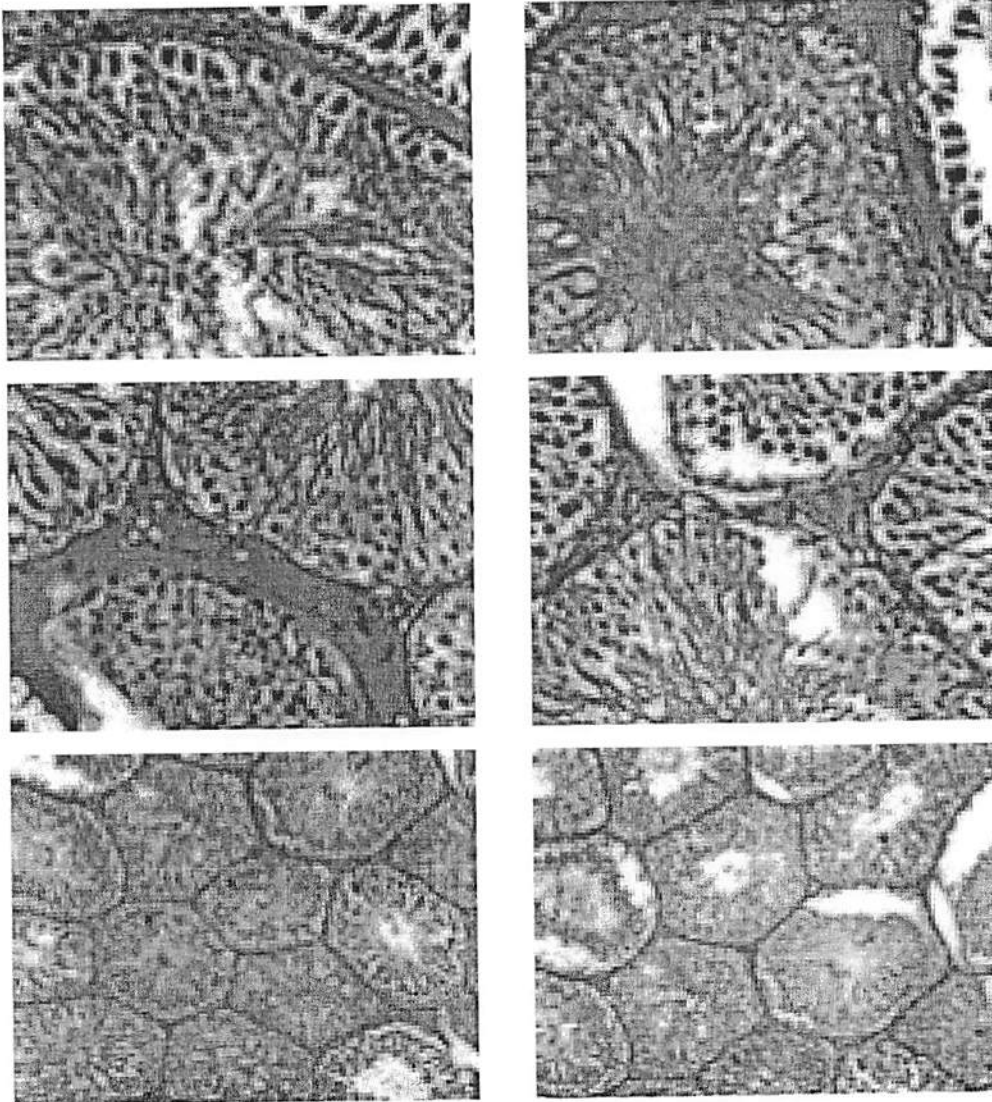


P 1-3

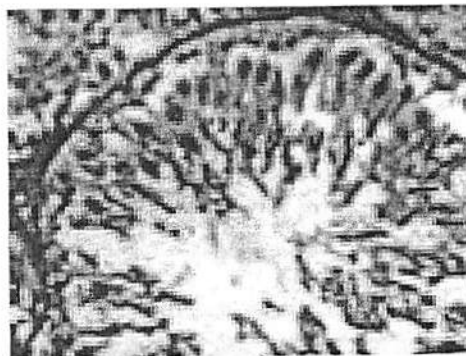
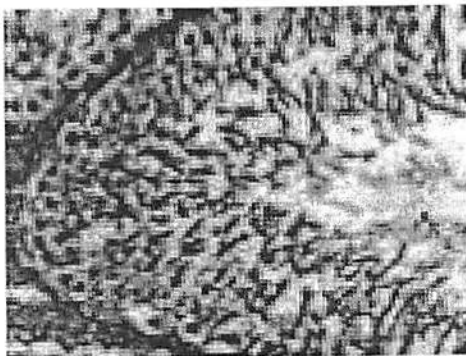
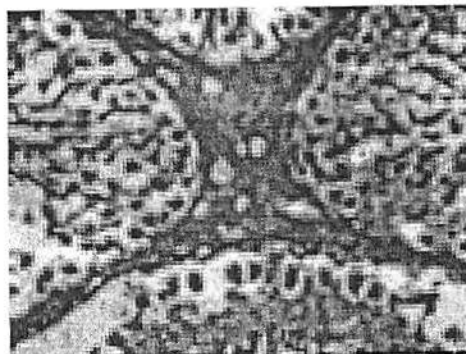
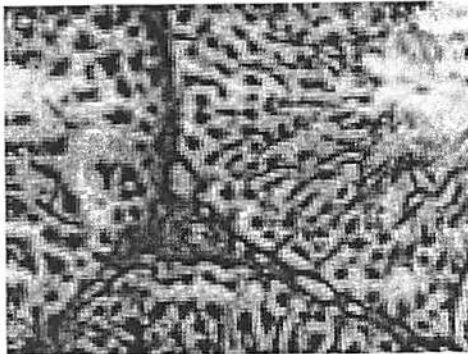
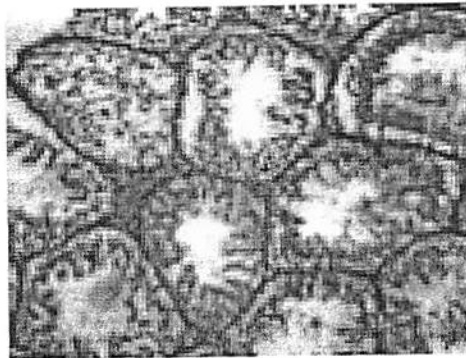
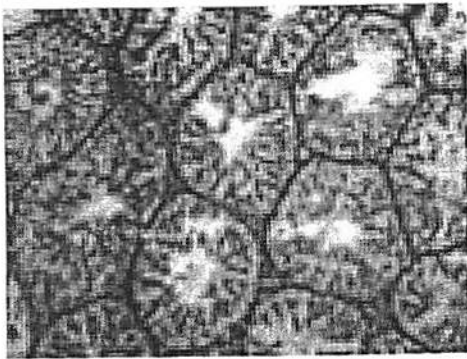




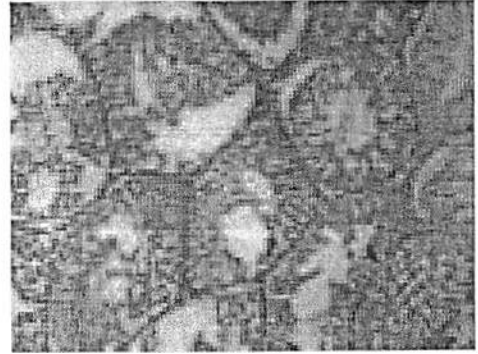
P 1-5



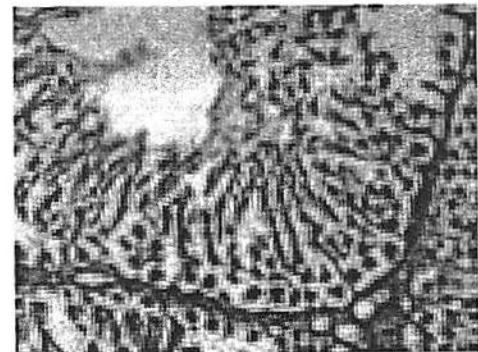
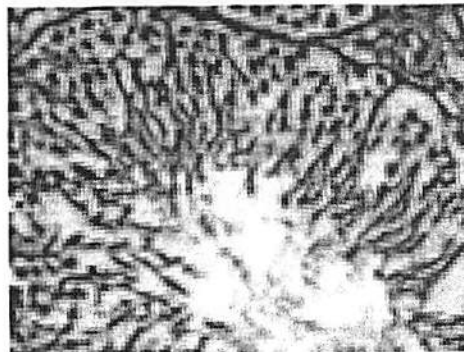
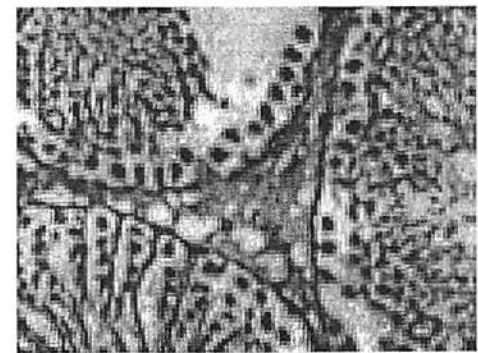
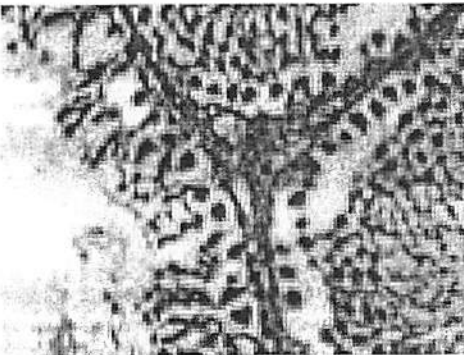
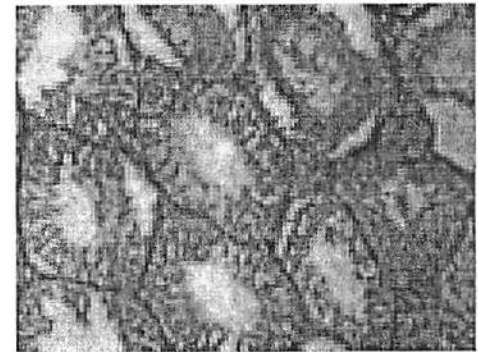
P 1-6

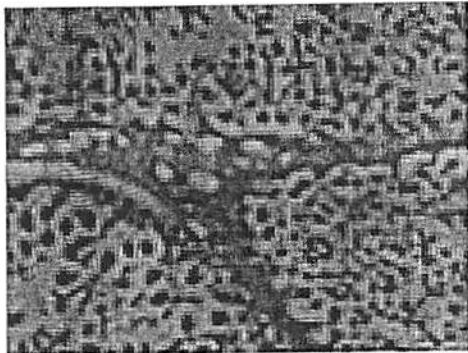
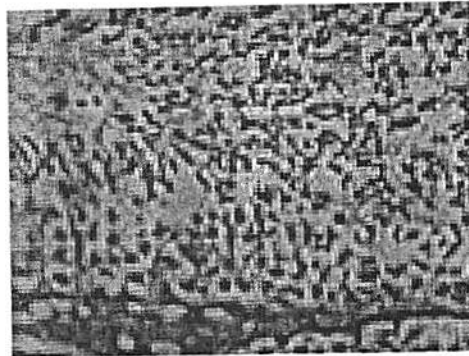


P 1-7

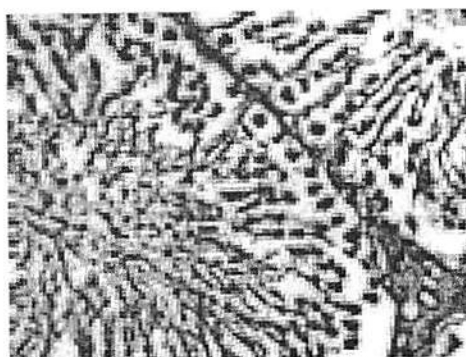
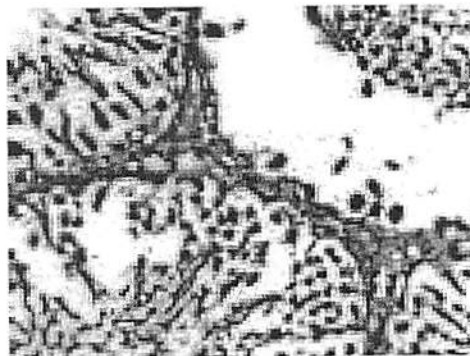
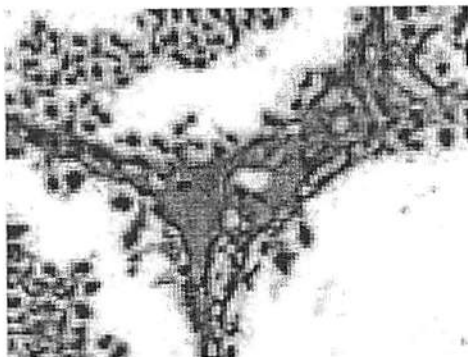


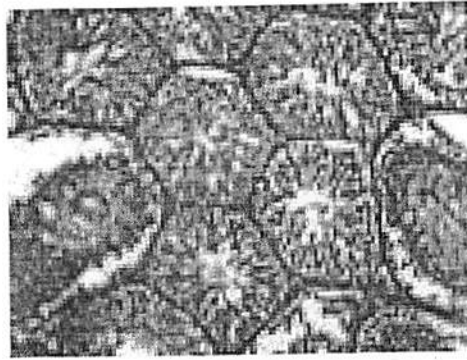
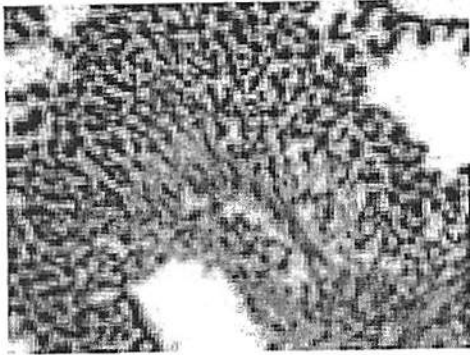
8-1 d



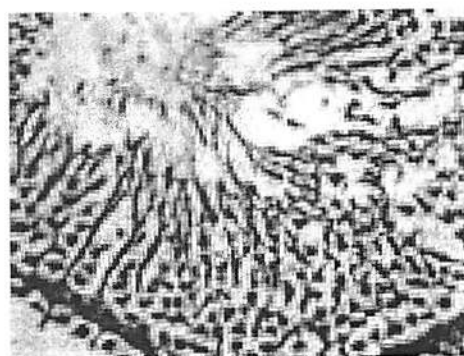
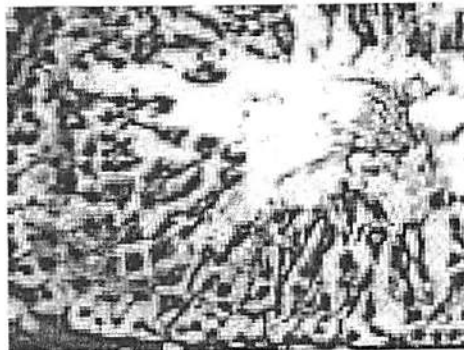
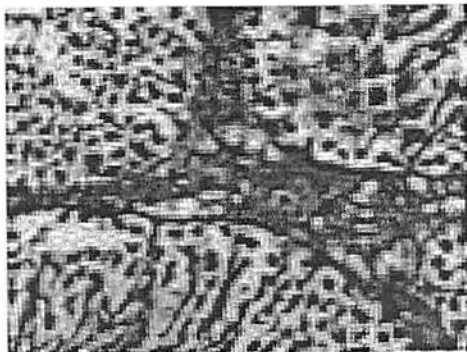
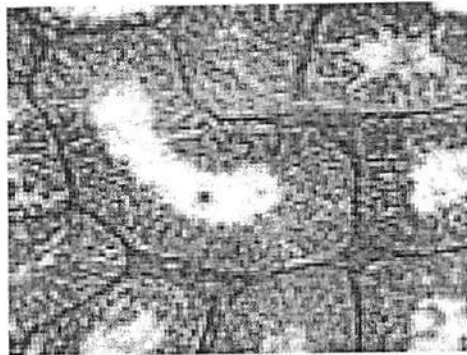
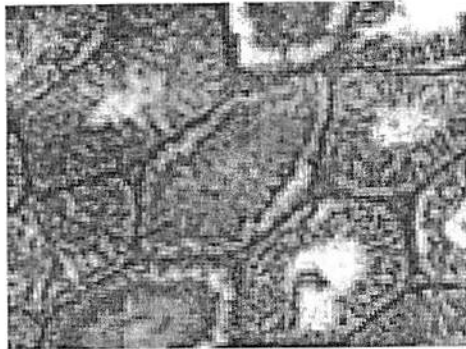


P 1-9

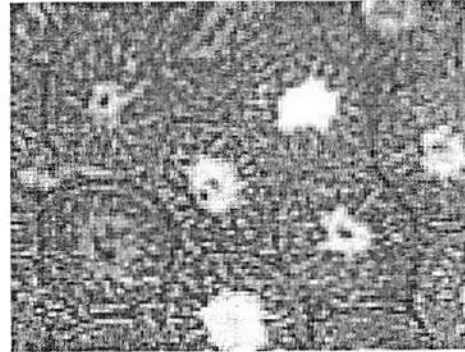
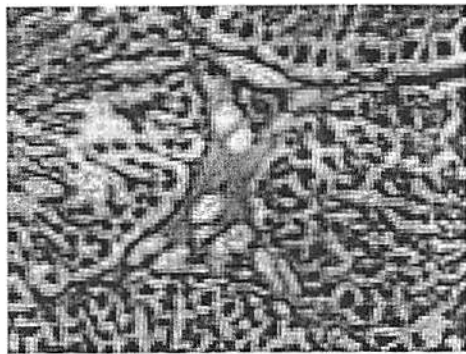
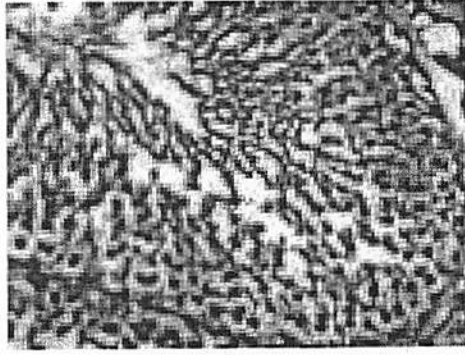
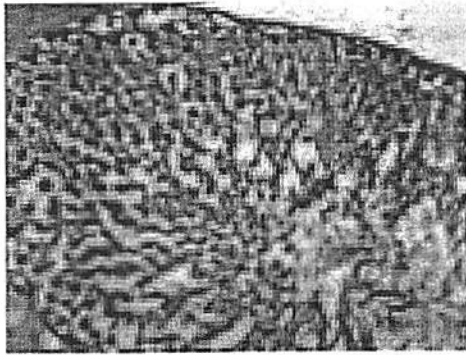




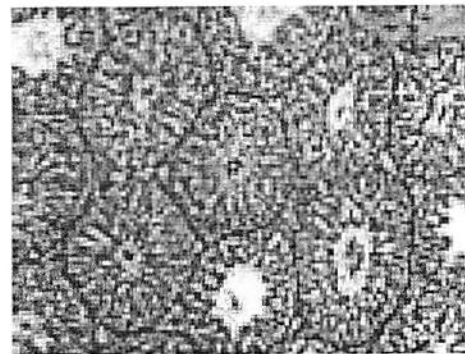
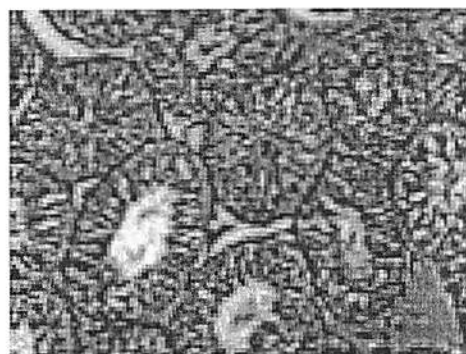
P 1-10

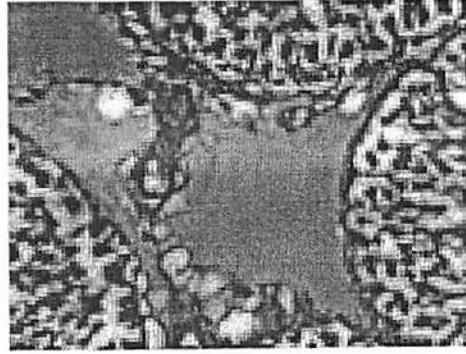
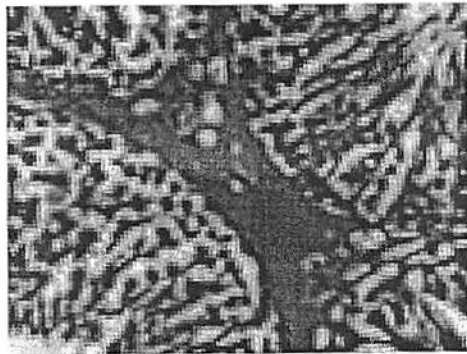
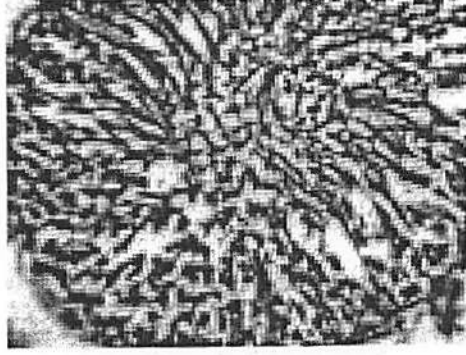
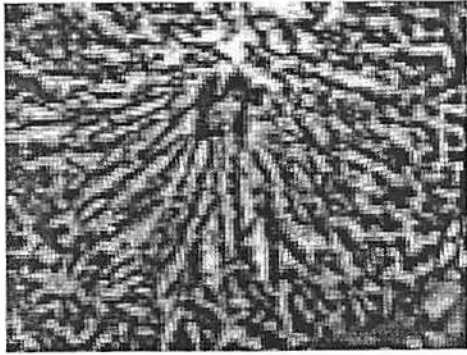


P 2-1

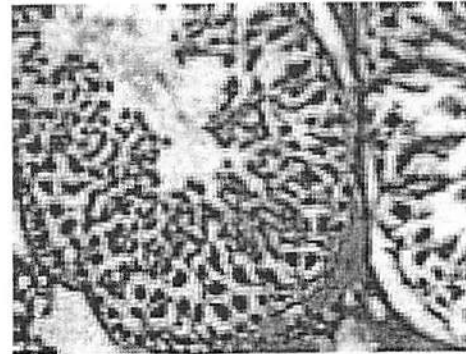
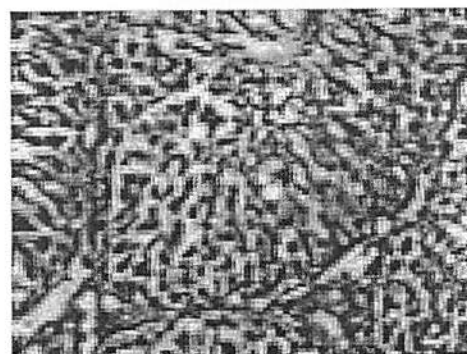
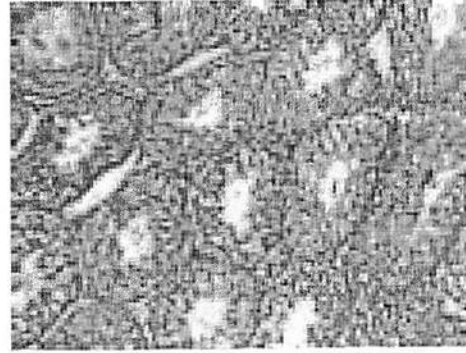
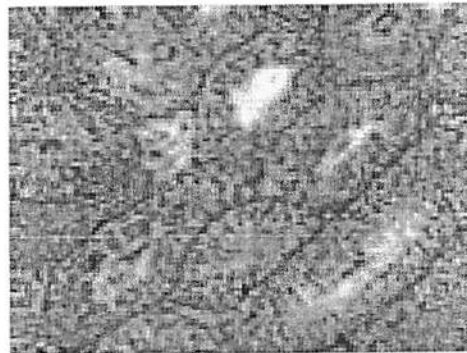


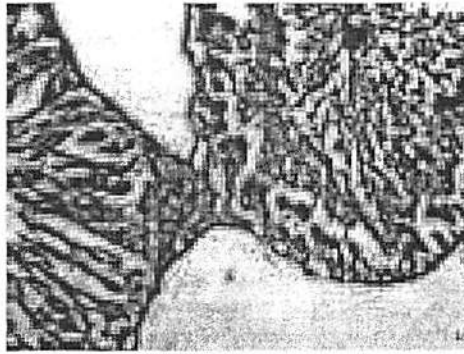
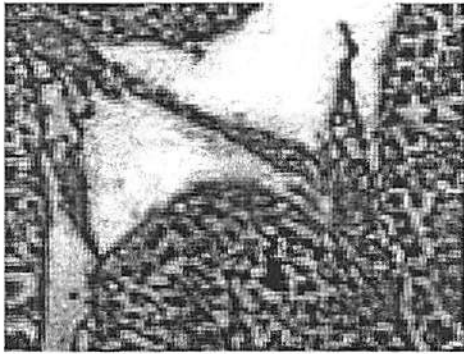
P 2-2



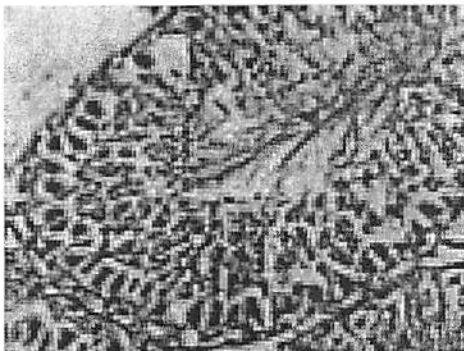
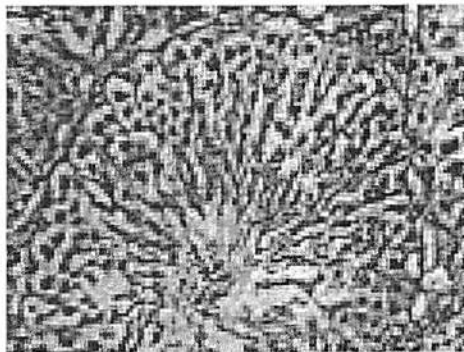
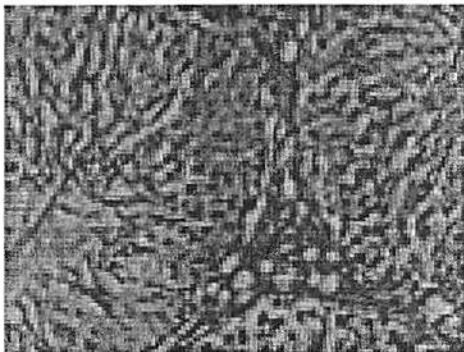
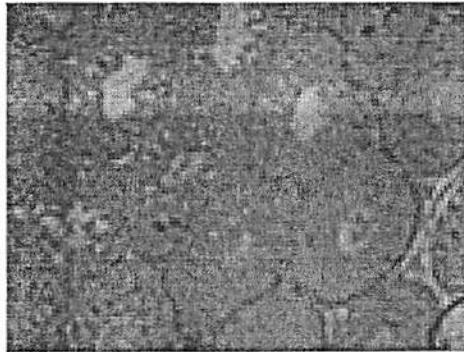


P 2-3

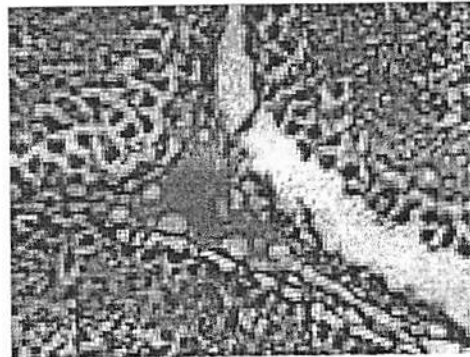
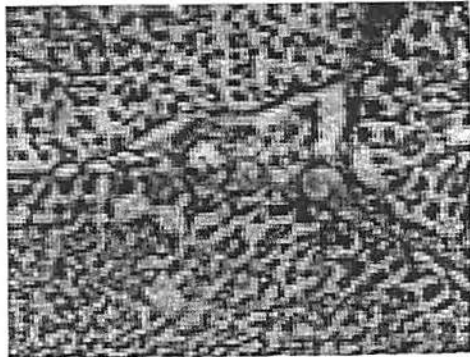
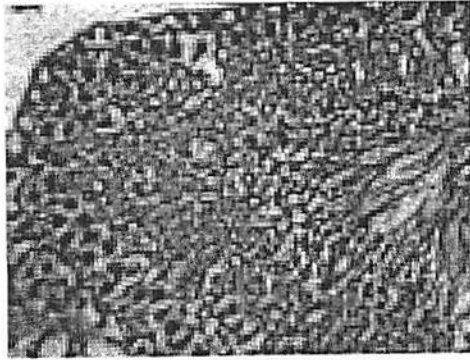
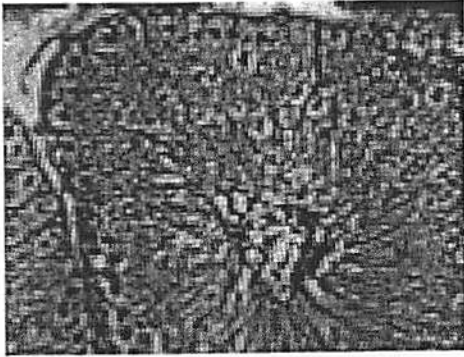




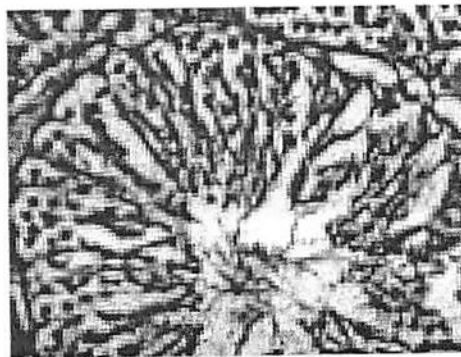
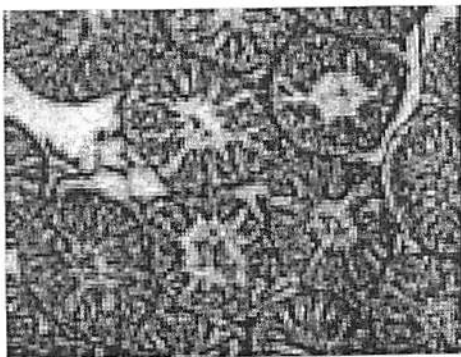
P 2-4

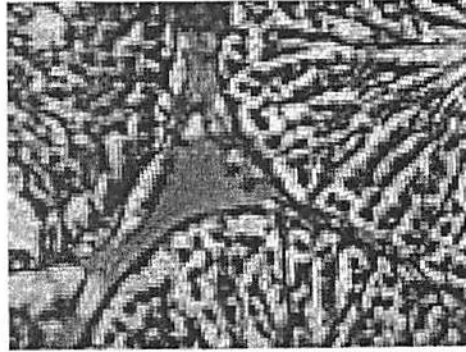


P 2-5

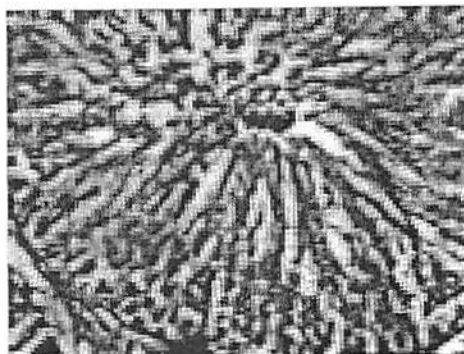
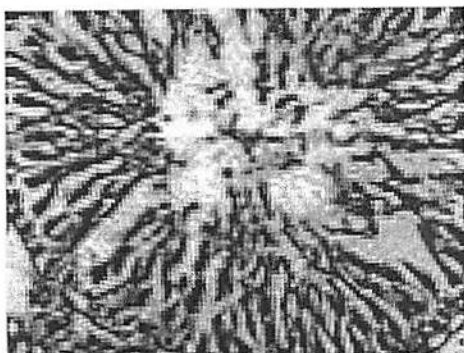


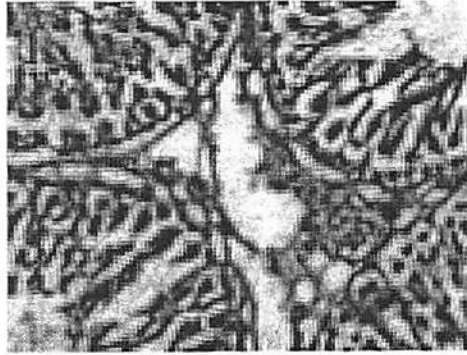
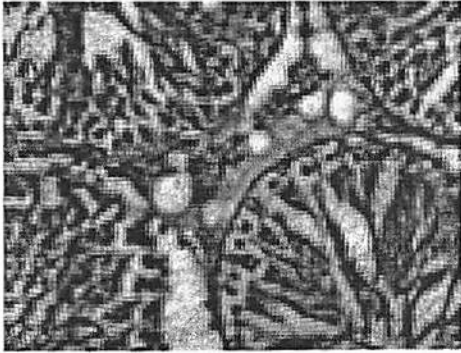
P 2-6



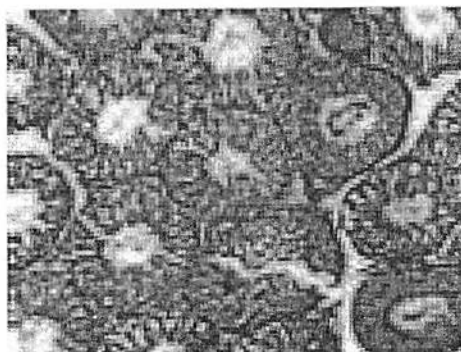
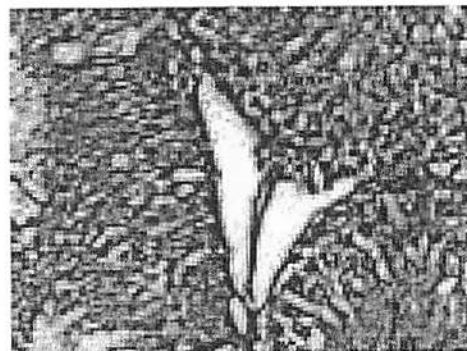
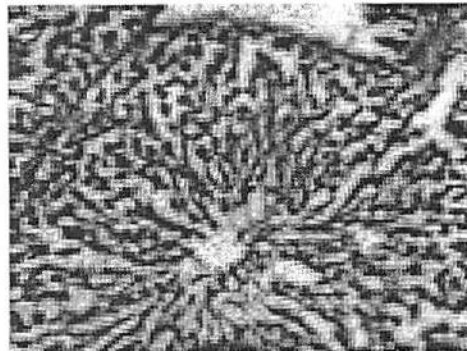
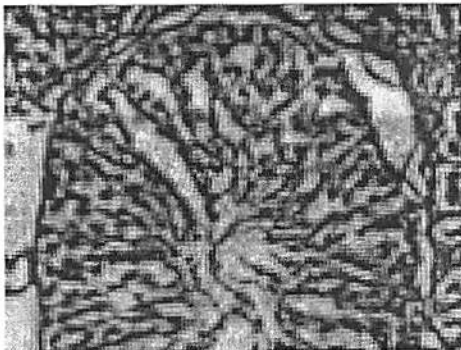


P 2-7

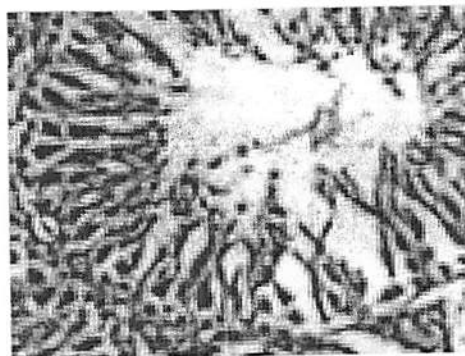
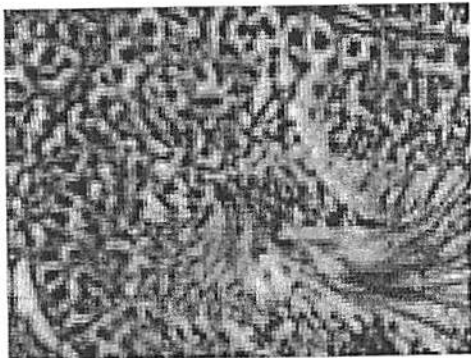
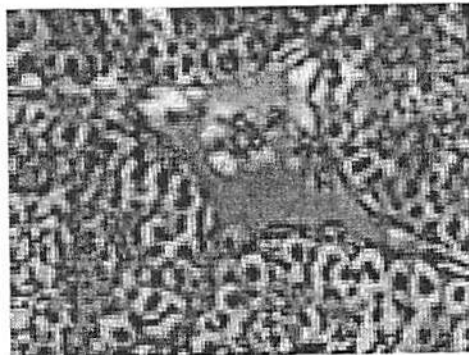
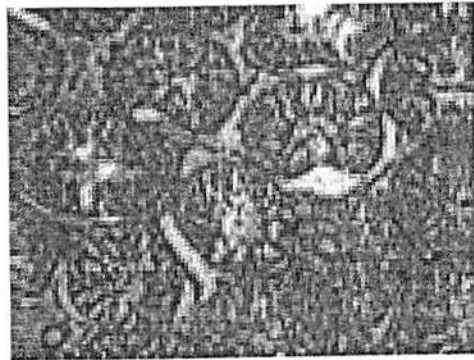
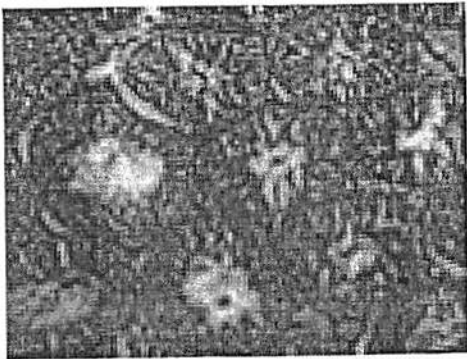




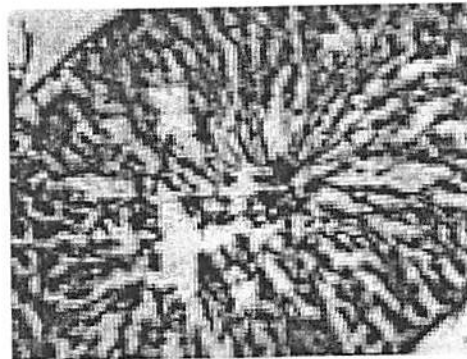
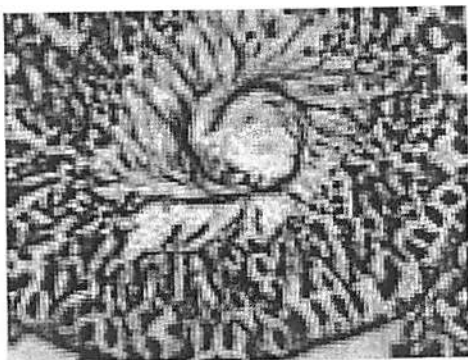
P 2-8

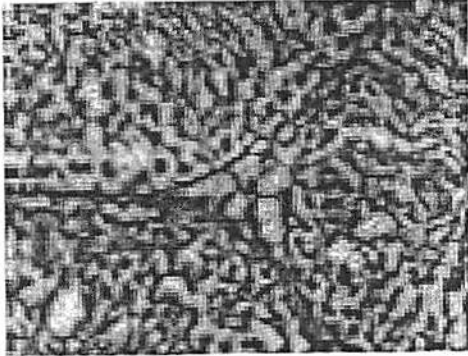
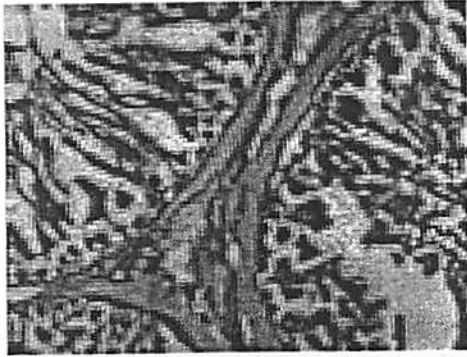


P 2-9

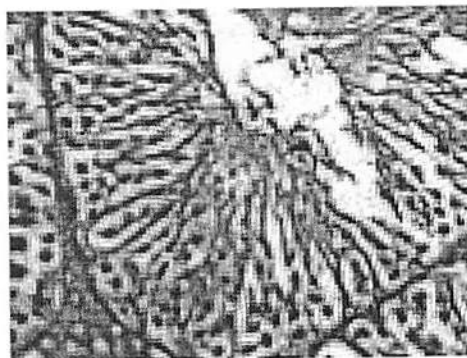
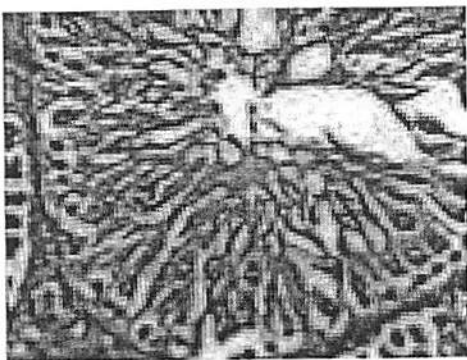
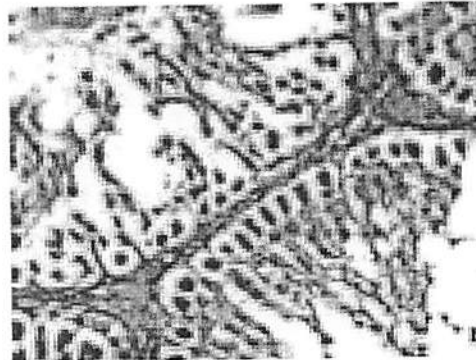
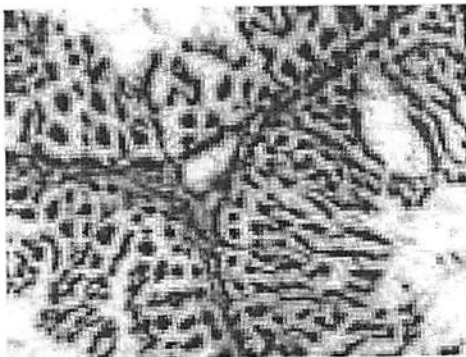


P 2-10



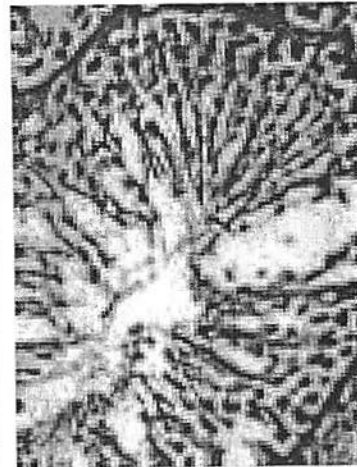
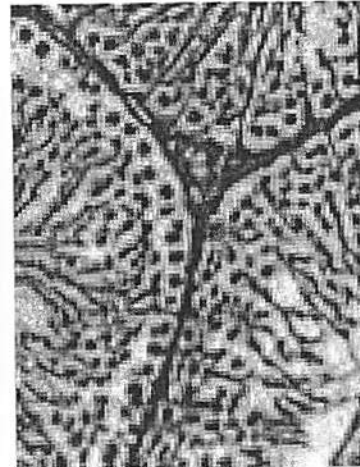


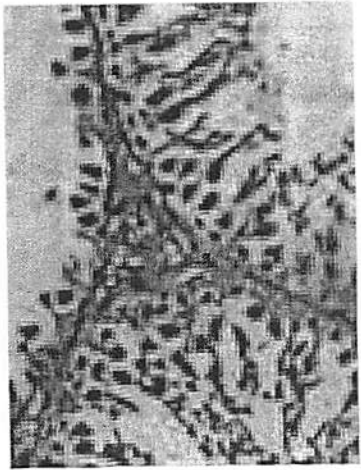
P 3-1





P 3-2



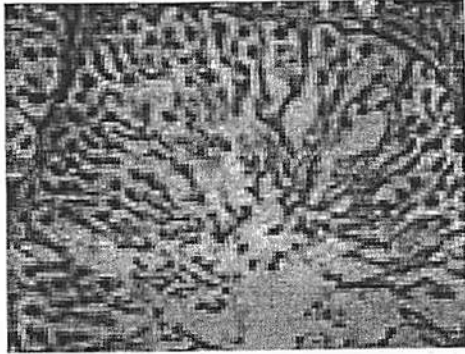


P 3-4

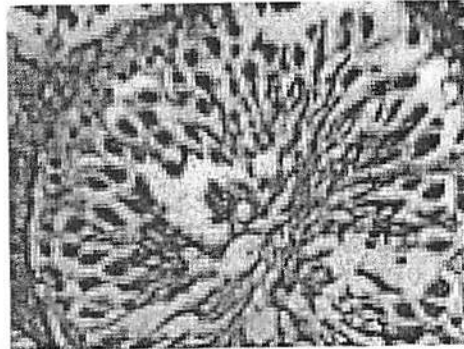
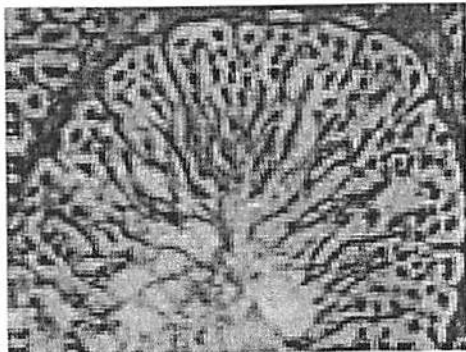
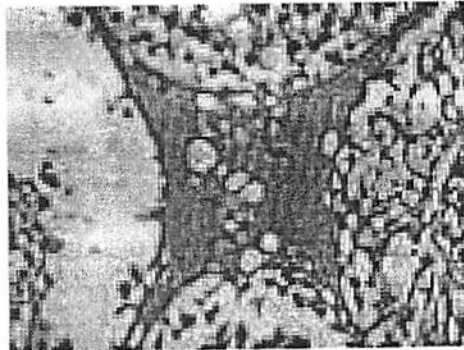
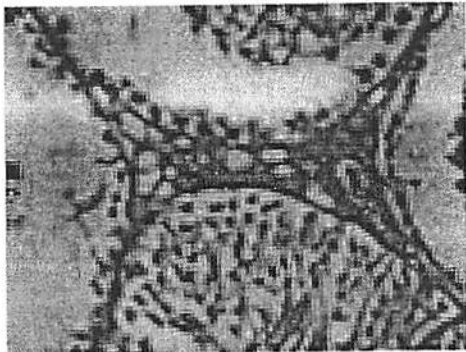


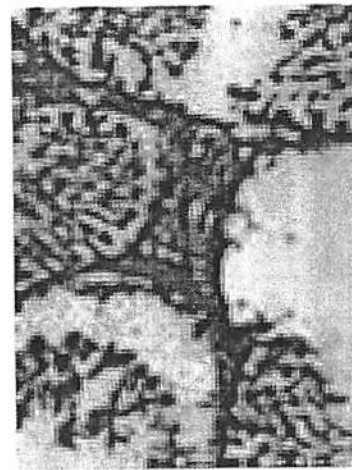
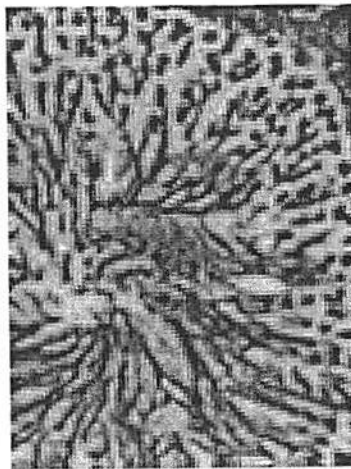
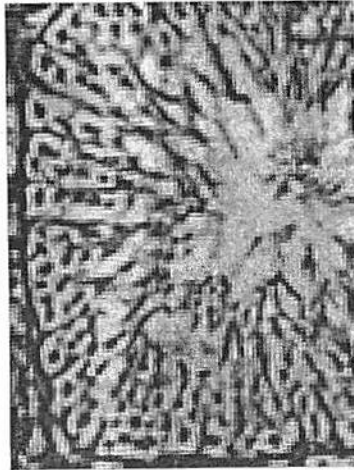
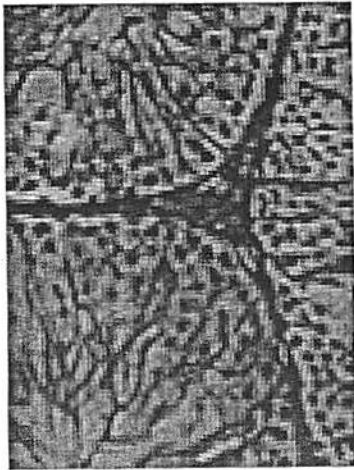
P 3-3





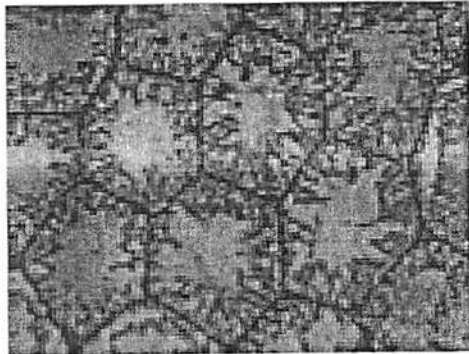
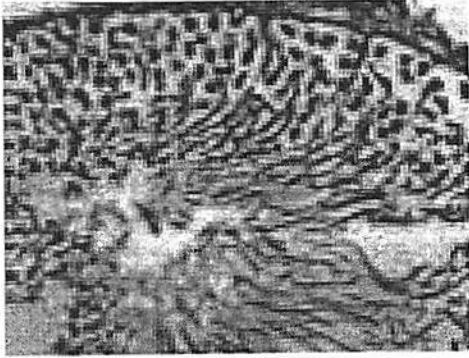
P 3-5



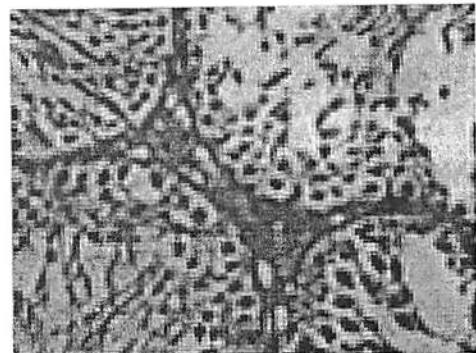
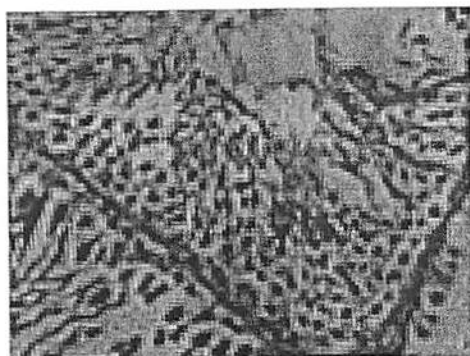
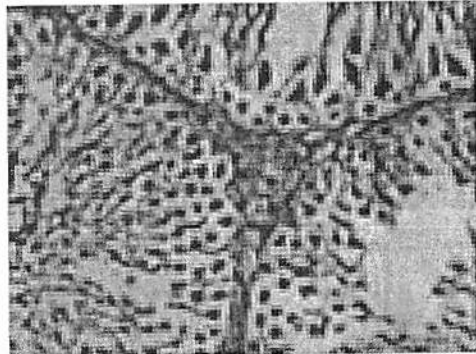


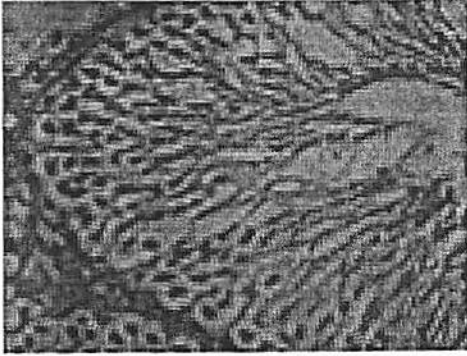
P 3-6

P 3-7

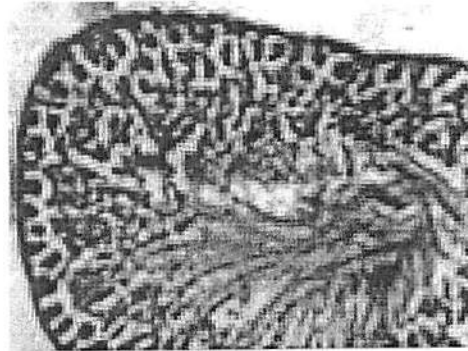
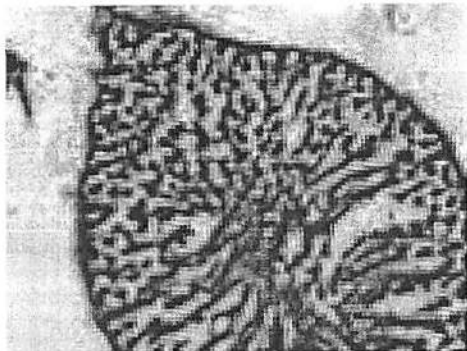
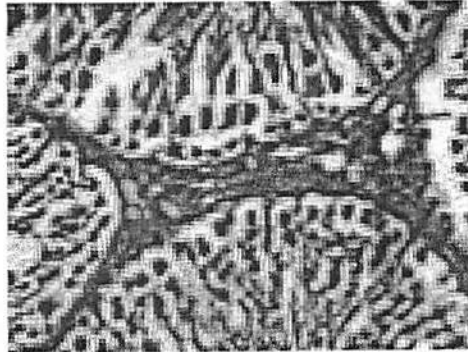
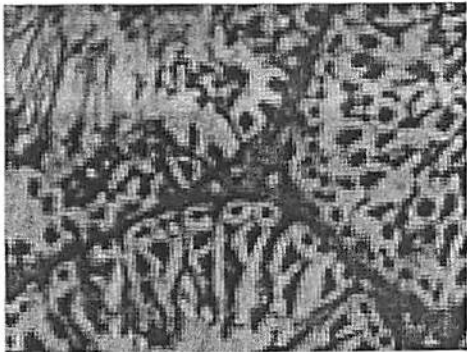


P 3-8

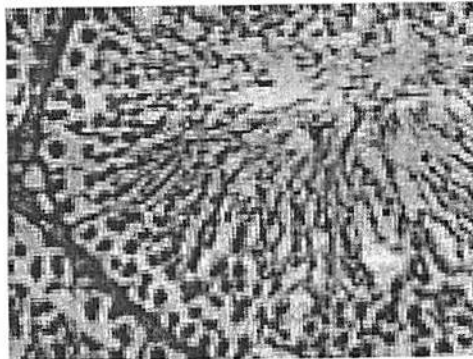
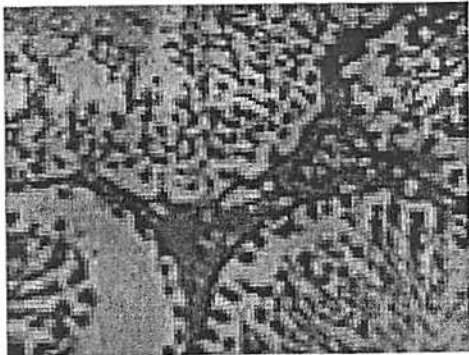
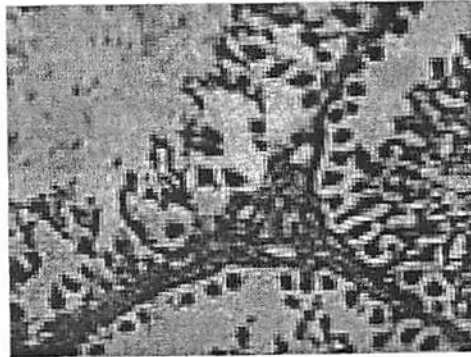
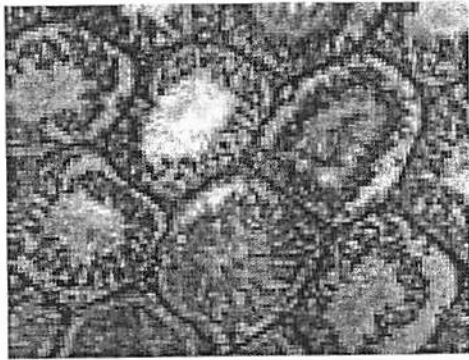




P 3-9



P 3-10



DAFTAR PUSTAKA

- Aa, J., et al., 2011. Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry Based Metabolomic Approach to Evaluating Toxicity of Triptolide . *Metabolomics*. 7(2), pp 217-225.
- Abidah, A., 2005. Pengaruh Fraksi Etanol 60% dan Fraksi Air Justicia gendarussa Burm. f. terhadap Aktivitas Hyaluronidase in vitro, *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Alfi, N.F., 2003. Pengaruh Fraksi Etanol dan Fase Air Gendarussa vulgaris Nees pada Proses Fertilisasi In Vitro Mencit, *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Amadea, J., Pesce, L., Kaplas, A. 1987. **Methods in Clinical Chemistry**. The C.V. Mosby Company St. Louis, Washington DC. Toronto. Pp 1062-1093.
- Amal, M.H., dan Hardaningsih. 2005. Republic of Indonesia, Bodeker, G., et al in **Who Global Atlas of Traditional, Complementary, and Alternative Medicine**. World Health Organization Centre for Health Development.
- Amin, A. 2009. Deteksi Flavonoid Gendarusin A pada Plasma Manusiasetelah Pemberian Ekstrak Justicia gendarussa Burm.f dengan HPLC, *Tesis*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Andreas, J. M., 1992. The Mouse, in: Gad, S. C., Chengelis, C.P., (Eds.), **Animal Models in Toxicology**. Marcell Dekker Inc, New York.
- Arrington, L. R., 1972. **Introductory Laboratory Animal Science, the Breeding, Care and Management of Experimental Animal**. The Interstate Printers and Publisers, Inc. Denville.
- Arsad, S.S., Esa, N.M., and Hamzah, H. 2014. Histopathologic Changes in Liver and Kidney Tissues from Male Sprague Dawley Rats Treated with Rhabdiphora Decursiva (Roxb.) Schott Extract, *Journal of Cytology and Histology*. Selangor, Malaysia.
- B POM RI. 2014. **Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan RI**



No. 7 Tahun 2014 tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis secara In Vivo.

- Cai, J; Zhao, X.L; Liu, A.W; Nian, H; and Zhang, S.H., 2011. Apigenin Inhibits Hepatoma Cell Growth through Alteration of Gene Expression Patterns, *Phytomedicine*, Vol 18, pp 366-373.
- Chakravarty, A.K., Dastidar, P.P.G., 1982. Simple Aromatic Amines from *Justicia gendarussa* ¹³C NMR Spectra of the Bases and their Analogues. *Tetrahedron*, Vol. 38 No. 12, pp 1792–1797.
- Coles, E.H. 1986. *Veterinary Clinical Pathology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company. Pp 153-203.
- Dalimartha, S., 2003. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Ed 3*. Jakarta: Trubus Ariwidya.
- Daniel, W. W. 1989. *Statistika Non Parametrik Terapan (Terjemahan oleh Elex dan Kantjono W)*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Depkes RI. 1995. *Materia Medika Indonesia Jilid IV*. Jakarta. Hal.109-110.
- Desbrosses, G., Stenhauser, D., Kopka, J., and Udvardi, M., 2005. *Metabolome Analysis Using GC-MS. Lotus Japonicus Handbook*. Pp 165-174.
- Dewi, R.K., 2012. *Deteksi Flavonoid Gendarusin A dalam Plasma Darah Pria Setelah Pemberian Ekstrak Etanol 70% Daun Justicia gendarussa Burm.f dengan LC MS/MS, Skripsi*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Ekaputri, A.A., 2015. *Studi Toksisitas Secara In Silico Kandungan Senyawa Flavonoid dan Alkaloid pada Daun Justicia gendarussa Burm. f., Skripsi*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Falconer, D.S., 1981. *Introduction to Quantitative Genetics, 4th ED.*, Longman Inc., New York.
- Febriyanti A.P., 2006. *Uji Toksisitas Subakut Daun Justicia gendarussa Burm. f. terhadap Kimia Darah Kelinci, Skripsi*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

- Feng, L., et al., 2016. LC/MS-based metabolomics strategy to assess the amelioration effects of ginseng total saponins on memory deficiency induced by simulated microgravity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Vol 125, pp 329-338. Elsevier
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics-The Link Between Genotypes and Phenotypes. **Plant Molecular Biology**. Vol 48, pp155-171.
- Ghosh, M.N., 1971. **Fundamental of Eksperimental Pharmacology**. Scientific Book Agency, Calcutta. Pp 84-90.
- Gilbert, S.F., 1988. **Developmental Biology 2nd Ed**. Sunderland, Massachusetts:
- Guyton, C. A. dan Hall, J. E. 1997. In : Setiawan, I. **Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 9**. Jakarta: EGC.
- Hadi, S. 2002. **Gastroenterology**. Penerbit Alumni, Bandung. Hal. 402-420
- Heyne, K., 1987. **Tumbuhan Berguna Indonesia, Jilid III**. Diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan. Jakarta.
- Ifadotunnikmah, F. 2007. Studi Profil Kromatogram Fraksi Air Daun Justicia gendarussa Burm. f pada Plasma Kelinci Jantan in Vivo, **Skripsi**. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Kiren, Y., Deguchi, J., Hirasawa, Y., Morita, H., and Prajogo, B. 2014. Justidrusamides A-D, New 2-aminobenzyl Alcohol Derivatives from Justicia gendarussa. **Journal of Natural Medicines**. Vol. 68, pp 754-758.
- Kustantonia, E., 1992. Pengaruh Infus Daun Justiciagendarussa Burm. f terhadap Kadar Testosteron dalam Serum Rattus norvegicus, **Skripsi**. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Liu, M., et al., 2016. Metabolomics study on the effects of Buchang Naoxintong capsules for treating cerebral ischemia in rats using UPLC-Q/TOF-MS, **Journal of Ethnopharmacology**, Vol 180, pp 1-11. Elsevier.
- Loomis, T., 1978. **Essential of Toxicology, 3rd Edition**. Philadelphia: Lea & Febriger. P 22.

- Lu, F.C., 1995. **Asas Organ Sasaran dan Penilaian Resiko, Edisi II.** UI Press. Hal. 85-100.
- Markham, K.R., 1988. **Cara Mengidentifikasi Flavonoid, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata.** Bandung: ITB.
- Martoprawiro, S.S., 1996. **Peranan Patologi Anatomi dalam Menegakkan Diagnostik Penyakit.** Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Moeso, S. dan Agus, P., 1985. **Laporan Perjalanan ke Jayapura Sentani (Irian Jaya).** Yogyakarta: Fakultas Biologi UGM.
- Mutschler, E., 1991. **Dinamika Obat.** Ed V. Bandung: ITB. Hal 192-195.
- Nihayah, S., 2005. **Uji Toksisitas Fasa Air dari Ekstrak Etanol Daun Justicia gendarussa Burm. f. terhadap Sel Limfosit Normal Manusia Secara In Vitro, Skripsi.** Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Nuryantie. 2006. **Penetapan Kadar Na⁺, K⁺, Cl⁻, Kalsium, dan Glukosa Darah Kelinci pada Pemberian Fraksi Air Bebas Alkaloid Daun Justicia gendarussa Burm. f., Skripsi.** Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Prajogo, B.E.W., Hery, A.H., dan Aucky, H., 1998. **Efek Inhibitor Fraksi Diklorometan dan Metanol dari Justicia gendarussa Burm. f. Terhadap Enzim Hialuronidase Mencit, Research Report.** Surabaya: Lembaga Penelitian Unair..
- Prajogo, B.E.W., Widjiati, dan Epy,M.L., 1999. **Uji Toksisitas Daun Gendarussa vulgaris Ness terhadap Gambaran Darah dan Histopatologi Hati, Ginjal, dan Usus Mencit Jantan, Research Report.** Surabaya: Lembaga Penelitian Unair.
- Prajogo, B.E.W., Wiwiet, Widjiati, Hamdi, Aucky, Mulja, dan Noor, C., 2001. **Potensi Gendarussa vulgaris Nees sebagai Bahan Kontrasepsi Pria. Penelitian Kerjasama antara BKKBN Pusat dan Lab. Botani Farmasi-Farmakognosi Unair.** Surabaya.

- Prajogo, B.E.W., 2002. **Aktivitas Antifertilitas Flavonoid Daun Gendarusa vulgaris Ness, Penelitian Eksperimental Pencegahan Penetrasi Spermatozoa Mencit dalam Proses Fertilisasi in Vitro, Disertasi.** Surabaya: Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- Prajogo, B.E.W; Dudi, S; dan Mulya, H.S., 2007. **Analisis Kadar Gendarusin A Pada Tanaman Budidaya Justicia gendarussa Burm. f., Jurnal Farmasi Indonesia, Vol 3. Hal. 176-180.**
- Prajogo, B.E.W., 2014. **Autentik Tanaman Justicia gendarussa Burm.f. sebagai Bahan Baku Obat Kontrasepsi Pria.** Surabaya: Airlangga University Press.
- Prasmawari, S., 2001. **Uji Aktivitas Anti Inflamasi Ekstrak Metanol Daun Gendarusa vulgaris Nees pada Tikus Putih, Skripsi.** Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Price, S.A., and L.M. Wilson. 1984. **Patofisiologi (Konsep Klinik Proses-Proses Penyakit.** Ed 2. Alih bahasa oleh Adji Darma. Jakarta: EGC. Hal. 19-29.
- Putriani, N.E., 2007. **Uji Karsinogenik Fase Air Justicia gendarussa Burm. f. pada Testis, Hati, Ginjal, Usus, dan Paru Mencit Jantan (Mus Musculus), Skripsi.** Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Robbins, S.L.M.D., and V.M.D. Kumar, 1992. **Buku Ajar Patologi 1.** Ed 4. Jakarta: EGC. Hal. 2-18.
- Romzah, V.R., 2005. **Pengaruh Fase Air Daun Gendarussa vulgaris Nees terhadap Perubahan Histopatologi Hati, Ginjal, dan Usus Halus Mencit Jantan, Skripsi.** Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Satapathy, A.K; Gunasekaran, G; Sahoo, S.C; Amit, K; Rodrigues, P.V., 2009. **Corrosion Inhibition by Justicia gendarussa Plant Extract in Hydrochloric acid Solution, Corrosion Science, Vol 51, pp 2848-2856.**
- Sherma, J., 2003. **Basic TLC techniques, materials, and apparatus.** In: Sherma, J and Fried, B. (eds), **Handbook of Thin Layer Chromatography: revised and expanded, 3rd edition.** Marcel Dekker, Inc, New York.

- Siti, B.K., 1996. **Immunology: Diagnosis & Prosedur Laboratory**, Ed 3. Jakarta: Fakultas Kedokteran UI.
- Smith, J.B. dan Mangkoewidjojo, S., 1988. **Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis**. Jakarta : UI-Press
- Stahl, E., 1969. **Thin Layer Chromatography a Laboratory Handbook**, Second Edition, Springer International Student Editon, Tokyo, Toppan Company Limited, Japan.
- Steenis, V.C.G.G.J., 1978. **Flora untuk Sekolah di Indonesia**. Jakarta: Pradnya Paramitha. Hal.393-414.
- Steenis, V.C.G.G.J.,1997. **Flora**. Moeso Surjowinoto, Penerjemah. Jakarta: Pradnya Paramitha. Hal. 324.
- Sugiyanto. 1995. **Petunjuk Praktikum Farmakologi Edisi IV**. Fakultas Farmasi Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi. Yogyakarta: UGM.
- Sukardja, I. D. G. 1998. Correlation of Clinical and Patohlogical Diagnosis of Neoplasm. **Modern Pathology for Service and Research on Cancer**. P 15-35.
- Tjitrosoepomo, G., 1991. **Taksonomi Tumbuhan**. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Touchstone, J. C. and Dobbins, M. F., 1983. **Practice of Thin Layer Chomatography**, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York.
- Underwood, J.C.E., 1996. **Patologi Umum dan Sistemik**. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Verpoorte, R., Choi, Y.H., and Kim, H.K., 2007. NMR-Based Metabolomics at Work in Phytochemistry. **Phytochem. Rev.** Springer.
- Wahi, A.K., Wahl, S.P., and Kapoor, R., 1974. Chemical Study of The Leaf of *Justicia Gendarussa* Burm. f. **Journal Res. Medicine**. 9:1. 65-66.
- Wardani, Y.I., 2003. Uji Toksisitas Hepar Fraksi Air Daun *Gendarussa vulgaris* Nees. Pada Sistem Suspensi Hepatosit Tikus Terisolasi dengan Parameter Enzim GPT, **Skripsi**. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Wolfensohn, S., dan Lloyd, M., 2013. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 4th ed., Wiley-Blackwell.

Zaneveld, L.J.D., 1976. Sperm Enzym Inhibitors an Antifertility Agents, in: Human Semen and Fertility Regulation in Men. E.S.E. Hafez (Ed.), St Louis, London: CV. Mosby Company. Pp 576-578.

THE ACUTE TOXICITY STUDY OF 70% ETHANOL EXTRACT OF *J. gendarussa* LEAVES ON MICE

Bambang Prajogo EW¹, Gunawan Indrayanto¹, and Rakhmawati¹

¹Pharmacognosy and Phytochemistry Department, Faculty of Pharmacy,
Airlangga University, Surabaya

ABSTRACT

Justicia gendarussa is a native plant that have antifertility effect. The main compound which is Gendarusin A. Gendarusin A is flavonoid that can prevent the hyaluronidase enzyme of sperm to penetrate the cervix. From the previous study, *J. gendarussa* known that didn't had any harmful effect to the experimental animals, but for the further research, it must be confirm if it's not harmful for experimental animals. This aim of this study to analyse the toxicity effect of 70% Ethanol Extract of *J. gendarussa*. This study was done in mice to checked the acute toxicity effect. The result shown that there was no toxicity effect happened to the mice.

INTRODUCTION

Justicia gendarussa is a tropical plant which grow in tropic land including Indonesia. This plant have been used by society of Papua as male contraceptive (Prajogo, 2014). Major components from genus *Justicia* are alkaloid, lignan, flavonoid and terpenoid. *Gendarussa* leaves also contain tannin, potassium, volatile oil, calcium oxalate and also (justicina) which is toxic.⁸ Some research had been done to understand the activity of *gendarussa* leaf as antifertile. The main mechanism of *gendarussa* leaves is inhibit the hyaluronidase enzym of spermatozoa wich can be competitive and reversible. Hyaluronidase enzym is an enzym that can be found in the head of spermatozoa (acsochrome) (Gilbert, 1988). Fertility can occurs when spermatozoa passing the ovarium cell. The hyaluronidase enzym exist to help spermatozoa's penetration through the layers of ovum wall cell, so when the hyaluronidase's activity is prevented, the spermatozoa penetration failed and the fertilisation prosses never happend (Zaneveld, 1976). The inhibition activity happen because the flavonoid content of *gendarussa*.

Commented [a1]: Citation should be by numbers only

Based on FDA (Food and Drug Administration) report in the Poisonous Plant Database (Plant List), gendarussa is one of the poisonous plant. From the previous research, toxicity study used the water and 60% ethanol phase of gendarussa leaves on mice, shown that it was very unharmed, had no teratogenic effect on mice, and there was no change in the histopathology of testicle, liver, intestine, and the lung tissue. But, based on Romzah research in 2005, the mice that given water phase of gendarussa in 52 days, the histopathology of liver was changed, damage the small intestine's mucus, but unaffected the renal histopathology. Because of that, before gendarussa formulated as a medicine, the further study still needed, especially in the toxicity study. In this study, the toxicity study done in mice using 70% ethanol phase of gendarussa. The 70% ethanol phase was alkaloid free, the alkaloid was suspected as the main substance that gave the toxic effect.

Acute Toxicity

Oral acute toxicity study is a study to detect toxic effect that shown in short term time after the dosage test given in single dose, or repeat dose during 24 hours. When the dosage given repeatedly, the interval must less than 3 hours. Dosage should be given once or several times during 24 hours. After 7-14 days later or after 24 hours, then the symptoms happened on the mice was recorded. The symptoms referred to the amount of the death mice, the estimated time of the mice's death and the toxicity symptoms to determined the LD50. LD50 is a single dose of a substance that statically expected can kill 50% of the experimental animals. The LD50 value was useful for evaluate the accidental toxicity effect, classifying the chemical substance based on the relative toxicity, and to planing the next reserach about subchronic and acute toxicity on animal.

The result of acute toxicity was evaluate based on the dangerous criteria from GHS (*Gobally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*) stated of *Thirteenth Addendum to The OECD Guidelines for The Testing of Chemical* (2001). Classification criteria based on OECD (*Organization of Economic Cooperation and Development*) for drug, traditional drug, and other substance (*Generally Recognized As Safe/ GRAS*) like foodstuffs, the acute category used the criteria as presented in the table 1.

Tabel 1. Classification criteria for test preparation (Hodge dan Sterner, 1995)

Toxicity Level	Category	Oral LD50 (on mice)
1	Extremely Toxic	Less than 1 mg/kg
2	Highly Toxic	1-50 mg/kg
3	Moderately Toxic	50-500 mg/kg
4	Slightly Toxic	0,5-5 g/kg
5	Pratically non toxic	5-15 g/kg
6	Relatively not harmful	> 15 g/kg

MATERIAL AND METHOD

Materials

Justicia gendarussa 70% ethanol extract, Sodium citrate, ethanol 70%, Carboxymethylcellulos sodium, Aquadest, Acetonitrille, Methanol, Male mice Balb/C strain, analitical scale, animal scale, plastic cage with the seal, injection needle, tweezers, sonde lambung.

Method

1. Preparation of 70% Ethanol Extract of *Justicia gendarussa*.

Simplicia gendarussa powder was drying by oven in 40°C then grinded, the *simplicia* powder was neutralized with acid used HCl pH 3 within 3x24 hours to removed the alkaloid substance, then it was washed until the pH was neutral. The neutal dry *simplicia* powder was macerated with 70% ethanol during 3x24 hours and constantly stirred every 8 hours. The liquid extract then evaporated until became viscous extract.

2. Preparation of Experimental Animals

In this study, the experimental animals used was mice with the taxonomi:

Kingdom : Animalia
 Filum : Chordata
 Class : Mamalia
 Ordo : Rodentia
 Famili : Muridae
 Genus : Mus
 Species : *Mus musculus*

In this study, the experiment was used male mice Balb/C strain, the weight about 15-30 grams and attain the age of 6-8 weeks. The mice was selected with average weight for every group, the differences of the weight must be less than 20% of average. The weight must measured before the treatment, during the treatment and after the treatment. The weight checked twice in a week. The animals used in this study was separated into two groups, which was control and treatment groups, each group consist of 5 mices.

3. Sample Preparation

Preparation of Sodium CMC 0,5% Mucilago : 0,5 grams of Sodium CMC was poured on hot water (the water volume was 20 times as much as the sodium CMC), let it swollen about 15 minutes. Grind it until the mucilago formed, then moved into calibrated bottle and add water until 100 mL. The mucilago then was gave to the control group orally.

Preparation of Sample Solution : 0,5 grams sodium CMC was poured on hot water (the water volume was 20 times as much as the sodium CMC) let it swollen about 15 minutes, add 2000 mg of 70% ethanol extract of *J. gendarussa*, grind it until the mucilago formed. Moved it into calibrated bottle and add water until 100 mL. The mucilago then was gave to the treatment group orally.

4. Treatment done to the experimental animals

The mice was separated into two groups, control and treatment group. Before the treatment gave to the mice, the mice was fasted about 3-4 hours, only water should be given. Suspension of sodium CMC given to the control groups orally, for the treatment groups, the extract was given one time based on the mice's weight orally, then monitoring was done during 24 hours and continued for 14 days.

Control groups : as a control, given 0,5% Sodium CMC Suspension

Treatment groups : given the sample solution (*J. gendarussa* extract 2000 mg/Kg weight)

5. Data Analysis

The experimental animal was observed at least 30 minutes after the treatment solution was given, monitoring continued each 4 hours during 24 hours in 14 days. The time when the toxicity symptoms showed and ended must be recorded

systematically for each mice. Observation was done to the skin, fur, eyes, mucous membrane, respiration system, CNS, smamotoric activity, and the behavior.

Beside that, observation also done to the several condition, such as : tremble, seizure, salivation, diarrhea, faint, sleep and coma. Things that should observed from the behavior were: backward walked behavior, and body weight.

RESULT AND DISCUSSION

2000 mg/kg dossage that given to the mice didn't caused any harmful things happened to the mice, especially didn't caused death. There was no toxicity symptom occured, such as yellow eyes, abnormal behaviors (stay quiet in one place, biting their own body) and goose bumps. The weight of the mice during the treatment was presented in the table:

Table 2. The Mice Body Weight on Acute Toxicity Study

Mice Body Weight (g)			
	Beginning of study	Day 7	Day 24
Control group	28±1	29±1	31±2
Treatment group (2000 mg/k)	28±1	31±1	32±1

REFERENCES

- Hodge, B. J and Lawrence, G. (1995). *Organozation Theory: Strategic Appoarch 5th Ed.* International Edition. New Jersey: Prantice Hall International Inc.
- Thirteenth Addendum to The OECD Guidelines for The Testing of Chemical* (2001)
- Zaneveld, L. J. D , 1986, *Comparative Biochemistry and Physiology Part. B: Comparative Biochemistry*, Elsevier, Vol. 83 Issue 3.

EVALUASI ATAS CAPAIAN LUARAN KEGIATAN

Ketua : Prof Bambang Prajogo EW.,MS.,Apt
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 Judul :

Waktu Kegiatan : 2017 dan 2018

Luaran yang direncanakan dan capaian tertulis dalam proposal awal:

No.	Luaran yang direncanakan	Capaian
1.	Publikasi	Draft artikel
2.	Haki paten	Terdaftar
3.	Implementasi uji klinik	Protokol uji klinik, sedang berjalan (Rispro LPDP 2018)

1. PUBLIKASI ILMIAH

	Keterangan
Artikel Jurnal Ke-1	
Nama jurnal yang dituju	Natural Product Communication
Klasifikasi jurnal	Jurnal Nasional Terakreditasi/ Jurnal Internasional
Impact factor jurnal	0,8
Judul artikel	THE ACUTE TOXICITY STUDY OF 70% ETHANOL EXTRACT OF J. gendarussa LEAVES ON MICE
Status naskah (ber tanda)	
- Draft artikel	V
- Sudah dikirim ke jurnal	
- Sedang ditelaah	
- Sedang direvisi	
- Revisi sudah dikirim ulang	
- Sudah diterima	
- Sudah terbit	

2. BUKU AJAR

Buku Ke-1
Judul :
Penulis:
Penerbit:

3. PEMBICARA PADA TEMU ILMIAH (SEMINAR/SIMPOSIUM)

	Nasional	Internasional
Judul Makalah		Gendarusin an isolate from Justicia gendarussa Burm.f leaf as antiHIV
Nama Temu Ilmiah		Bromo Conference
Tempat Pelaksanaan		Surabaya
Waktu Pelaksanaan		11-12 Juli 2018

- Draft makalah		
- Sudah dikirim		V
- Sedang direview		V
- Sudah dilaksanakan		

4. SEBAGAI INVITED SPEAKER

	Nasional	Internasional
- Bukti undangan dari panitia		Chairman Bromo Conference
- Judul Makalah		Authentic Plant Justicia gendarussa Burm.f as Raw Material of Male Contraception
- Penulis		Author
- Penyelenggara		Bromo Conference
- Waktu Pelaksanaan		11-12 Juli 2018
- Tempat Pelaksanaan		Surabaya
- Draft makalah		
- Sudah dikirim		
- Sedang direview		
- Sudah dilaksanakan		V

5. UNDANGAN SEBAGAI VISITING SCIENTIST PADA PERGURUAN TINGGI LAIN

	Nasional	Internasional
- Bukti undangan		
- Perguruan tinggi pengundang	STIKES Rumaha Sakit Medika Krian, Sidoarjo.	
- Lama kegiatan	22 September 2018	
- Kegiatan penting yang dilakukan	Seminar : Pemanfaatan herbal alami untuk kesehatan.	

6. CAPAIAN LUARAN LAINNYA

HKI	Sediaan fitofarmaka kapsul gendarusa sebagai kontrasepsi pria. P00201608731
TEKNOLOGI TEPAT GUNA	
REKAYASA SOSIAL	
JEJARAING KERJA SAMA	
PENGHARGAAN	

LAINNYA	Dukungan utama pada protokol uji klinik : Kapsul ekstrak etanol 70% terfraksinasi daun <i>J. gendarussa</i> Burm. f SEbagai obat Kb pria non (proyek hilirisasi)
---------	--

Jika luaran yang direncakn tidak tercapai, uraikan alasannya:

Surabaya, November 2018
Ketua,



Prof Dr Bambang Prajogo EW.,MS.,Apt.

UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA

STUDI TOKSISITAS SUBKRONIK EKSTRAK ETANOL 70% DAUN JUSTICIA GENDARUSSA BURM. F. PADA TIKUS

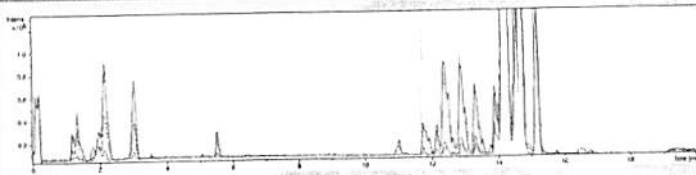
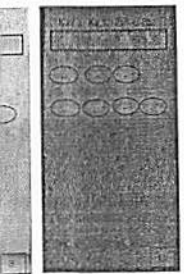
Prof. Dr. Bambang
Prof. Dr. Gunawan
Dra

Jl. Airlan
email : prayog
gunawanindra

(Food and Drug Administration) dalam Poisonous Plant Database (Plant List), termasuk salah satu tanaman yang potensial beracun. Berdasarkan penelitian akut menggunakan fase air dan fase etanol 60% daun gendarussa pada mencit tidak membahayakan. Fase air dan fase etanol 60% daun gendarussa juga tidak membahayakan. Bahkan fase air juga tidak mempunyai efek karsinogenik yaitu perubahan histopatologi pada testis, hati, ginjal, usus, dan paru mencit. Uji toksisitas menggunakan pemeriksaan makropatologi, biokimia klinis, dan histopatologi organ hati, paru, dan jantung tikus. Penelitian menggunakan tikus dengan umur 6-8 minggu, tikus sebanyak 40 tikus, dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari 10 ekor, 1 kontrol dan 3

melakukan metabolite profile masing masing organ tikus hasil dari uji toksisitas subkronik menggunakan alat LC-MS/MS dan dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis. Selain itu, pemeriksaan histopatologi pada organ tikus dan diketahui tidak ada perubahan membahayakan pada organ tikus yang diberi larutan uji ekstrak Justicia gendarussa. Hasil dari metabolite profile menunjukkan bahwa tidak ada toksik.

LCMS dan Histopatologi Ginjal Tikus



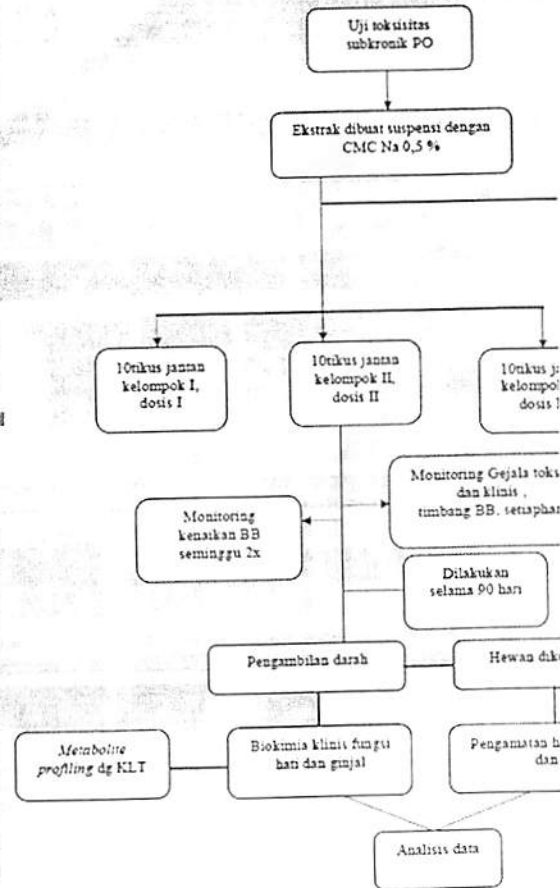
Hasil analisa KLT dan LCMS menunjukkan bahwa tidak ada metabolit atau residu Gendarusina yang berada dalam organ ginjal tikus, terlihat dari hasil KLT yang menunjukkan kesamaan profil kromatogram antara sampel kontrol dan perlakuan. Pada profil LCMS juga menunjukkan kesamaan profil antara kontrol dan perlakuan, sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak J. gendarussa tidak toksik.

Gambar Nihilidrin



Hasil pemeriksaan histopatologi ginjal tikus menggunakan mikroskop menunjukkan bahwa penampang kontrol (gambar atas) dan penampang perlakuan (bawah) tidak ada perbedaan pada histopatologi ginjal tikus. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian ekstrak J. gendarussa tidak menyebabkan adanya perubahan histopatologi organ dalam tikus.

Metode



Kesimpulan

1. Pengamatan studi toksisitas akut dihasilkan baik maksimal menunjukkan katagori praktis tidak toksik.
2. Dari studi toksisitas subkronik, organ hati ginjal limpa, usus dan testis hasil pengamatan histopatologi menunjukkan jaringan normal.
3. Hasil sementara analisis LCMS/MS tidak ada residu pada organ ginjal.

