

SKRIPSI

**TOKSISITAS AKUT TABLET FRAKSI ETIL
ASETAT-96 HERBA SAMBILOTO
(*Andrographis paniculata* Nees) PADA HATI
DAN GINJAL TIKUS WISTAR JANTAN**



**ALFIN LAILA NAJIHA
NIM. 051211133002**

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN FARMAKOLOGI DAN FITOKIMIA
SURABAYA**

2016



UNIVERSITAS AIRLANGGA FAKULTAS FARMASI
DEPARTEMEN FARMAKOGNOSI DAN FITOKIMIA
Kampus B UNAIR Jl.Dharmawangsa Dalam Surabaya 60286
Telp.: 031-5033710, Fax.: 031-5020514

Website : <http://www.ff.unair.ac.id> ; E-mail : farmasi@unair.ac.id

SURAT PERNYATAAN

Yang bertandatangan di bawah ini saya mahasiswa skripsi :

Nama : Alfin Laila Najiha
NIM : 051211133002

Menjelaskan dengan sesungguhnya bahwa, skripsi dengan judul utama: **Toksistasitas Akut Tablet Fraksi Etil Asetat-96 Herba Sambiloto pada Hati dan Ginjal Tikus Wistar jantan** merupakan penelitian yang ide dasar, serta pendanaan riset sepenuhnya dilakukan oleh dosen pembimbing skripsi yaitu: **Dr. Achmad Fuad Hafid, M.S., Apt. (NIP. 195212121981031009)**; sehingga kewenangan publikasi dan HAKI dari hasil penelitian tersebut melekat dan menjadi hak yang sah dari dosen pembimbing.

Demikian surat pernyataan ini dibuat dengan seksama untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya, sehingga kegiatan publikasi dan pengajuan HAKI yang dilakukan oleh dosen pembimbing atau ketua peneliti bukan merupakan kegiatan plagiarism, namun tetap menyertakan nama mahasiswa yang terlibat dan dosen lain dalam anggota grup riset.

Surabaya, 5 September 2016

Mengetahui:
Ketua Departemen
Farmakognosi dan Fitokimia



Dr. Aty Widwaruyanti, MSi, Apt
NIP. 196204261990022001

Yang Membuat Pernyataan,



Alfin Laila Najiha
NIM. 051211133002

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Alfin Laila Najiha

NIM : 051211133002

Fakultas : Farmasi

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir yang saya tulis dengan judul:

TOKSISITAS AKUT TABLET FRAKSI ETIL ASETAT-96 HERBA SAMBILOTO PADA HATI DAN GINJAL TIKUS WISTAR JANTAN

Adalah benar-benar merupakan hasil karya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini hasil plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 5 September 2016



Alfin Laila Najiha
NIM. 051211133002

Lembar Pengesahan

**TOKSISITAS AKUT TABLET FRAKSI ETIL ASETAT-
96 HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Nees)
PADA HATI DAN GINJAL TIKUS WISTAR JANTAN**

SKRIPSI

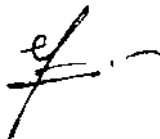
Dibuat untuk memenuhi syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi
pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

2016

Oleh:
Alfin Laila Najiha
NIM. 051211133002

Skripsi ini telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama,



Dr. Achmad Fuad Hafid, M.S.
NIP. 195212121981031009

Pembimbing Serta,



Dr. Widjiati, M.Si., drh.
NIP. 196209151990022001

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan sebaik-baiknya.

Skripsi yang berjudul “TOKSISITAS AKUT TABLET FRAKSI ETIL ASETAT-96 HERBA SAMBILOTO PADA HATI DAN GINJAL TIKUS WISTAR JANTAN” ini ditulis untuk memenuhi sebagian persyaratan akademik untuk Mendapat gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada beberapa pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini. Pihak-pihak tersebut adalah:

1. Dr. Achmad Fuad Hafid, M.S., Apt., selaku dosen pembimbing utama yang senantiasa memberikan bimbingan, motivasi dan saran dalam penyelesaian skripsi ini
2. Dr. Widjiati, M.Si., drh. selaku dosen pembimbing serta. Terimakasih atas bimbingan, saran dan masukannya
3. Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Moh. Nasih. S.E., M.T., terimakasih atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menempuh pendidikan sarjana di Universitas Airlangga
4. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Dr. Umi Athijah MS., Apt., terimakasih atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menempuh pendidikan sarjana di Fakultas Farmasi
5. Dr. Aty Widyawaruyanti, M.Si., Apt., dan Prof. Dr. Bambang Prajogo E.W., MS., Apt., selaku dosen penguji skripsi, terimakasih atas saran

dan masukannya yang sangat bermanfaat untuk penyelesaian skripsi ini

6. Dra. Rakhmawati, M.Si., Apt., selaku dosen wali, yang telah memberikan masukan dan motivasi selama masa perkuliahan.
7. Ayah, Ibu, dan keluarga penulis yang telah memberikan dukungan dan motivasi terbesar hingga saat ini
8. Kementrian Agama RI, yang telah memberikan dukungan materiil selama proses pembelajaran di Universitas Airlangga
9. Sdri Lidya Tumewu, Sdri Hilkatul Iلمي, dan staff Satreps ITD Universitas Airlangga yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terimakasih telah senantiasa membantu selama proses penelitian
10. Rekan dan sahabat proyek malaria 2016, terimakasih atas kerjasamanya selama ini
11. Sahabatku CSS MoRA Universitas Airlangga angkatan 2012, terimakasih atas semangat dan motivasinya
12. Keluarga besar Pendidikan Apoteker —Amksilin 2012”, yang telah memberikan banyak sekali pengalaman dan semangat selama masa perkuliahan.
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini.

skripsi ini diharapkan dapat membawa manfaat bagi pembaca dan seluruh pihak yang membutuhkan informasi yang relevan.

Surabaya, 28 Juli 2016

Alfin Laila Najiha

RINGKASAN

**TOKSISITAS AKUT TABLET FRAKSI ETIL ASETAT -96
HERBA SAMBILOTO PADA HATI DAN GINJAL TIKUS
WISTAR JANTAN****Alfin Laila Najiha**

Secara empiris tanaman *Andrographis paniculata* telah digunakan sebagai tanaman obat untuk mengatasi malaria pada beberapa daerah di Indonesia. Berdasarkan penelitian terdahulu menunjukkan bahwa tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto yang mengandung senyawa diterpen lakton androgafolida yang terbukti dapat menghambat pertumbuhan parasit malaria. Untuk digunakan sebagai obat, suatu tanaman obat harus melewati uji efektivitas dan uji keamanan. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji keamanan yaitu uji toksisitas akut dengan menggunakan hewan coba tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan sebanyak 25 ekor yang dibagi dalam lima kelompok.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui toksisitas akut yang timbul setelah pemberian tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto dengan menentukan nilai LD_{50} , serta pengaruhnya terhadap organ hati dan ginjal. Pada penelitian ini, tikus diberi bahan uji secara peroral dengan dosis tunggal menggunakan metode *fixed dose procedure*: 5 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dan 2000 mg/kg BB. Dalam penelitian ini, dosis tertinggi yaitu dosis 2000 mg/kg BB digunakan sebagai dosis uji batas. Setelah pemberian sediaan uji, tikus diamati secara individu pada 4 jam pertama dan tiap 24 jam setelahnya selama 14 hari meliputi: gejala toksisitas dan berat badan, kemudian seluruh hewan yang masih hidup dikorbankan untuk dilihat kerusakan organnya secara makroskopik dan mikroskopik.

Hasil menunjukkan bahwa tidak terdapat tikus yang mati ataupun mengalami gejala-gejala toksisitas, dan tidak terdapat perbedaan secara bermakna pada hasil pengamatan histopatologi hati dan ginjal antar kelompok. Karena tidak terdapat hewan coba yang mati pada dosis tertinggi atau dosis uji batas 2000 mg/kg BB maka LD_{50} dari tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto adalah lebih dari 2000 mg/kg BB. Menurut panduan dari OECD, bahan yang memiliki LD_{50} lebih dari 2000 mg/kg BB maka tergolong bahan yang relatif aman. Pada pengamatan berat badan tikus juga tidak terdapat perbedaan secara bermakna, begitu pula pada pengamatan makroskopik organ hati dan ginjal.

ABSTRACT

**ACUTE TOXICITY OF ETHYL ACETATE-96 BITTER HERBS
(*Andrographis paniculata* Nees.) FRACTION TABLET IN LIVER
AND KIDNEY OF MALE WISTAR RATS**

Alfin Laila Najiha

This present study was aimed to determine LD₅₀, to establish the safety of ethyl acetate-96 bitter herbs/sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) fraction tablet by acute oral toxicity study in male wistar rats and to know the effects on liver and kidney of rats. Rats were administered the tablet per-oral in single dose using fixed dose method: 5 mg/kg of body weight, 50 mg/kg of body weight, 300 mg/kg of body weight dan 2000 mg/kg of body weight. All the animals were individually studied for mortality, behavioral pattern or toxicity symptoms and body weight changes for 14 days. No mortality and no significance different changes of body weight were found, and no toxicity symptoms at the highest dose 2000 mg/kg body weight which reveal the safety of these tablets in the doses up to 2000 mg/kg weight. Further, ethyl acetate-96 bitter herbs (*Andrographis paniculata* Nees.) fraction tablet did not cause the histopathological changes both liver and kidney of rats. overall, the results suggest that the oral administration of these tablets did not produce any significant toxic effect in rats in acute toxicity study.

Keyword: sambiloto, *Andrographis paniculata*, EA fraction, acute toxicity, liver histopathology, kidney histopathology

DAFTAR ISI

SAMPUL

HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH	iii
LEMBAR PERNYATAAN BUKAN HASIL PLAGIARISME	iv
LEMBAR PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
RINGKASAN	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Masalah.....	6
1.4 Hipotesis.....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	6

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Tanaman	7
2.1.1 Tinjauan Tentang <i>Andrographis paniculata</i> Nees	7
2.2 Tinjauan Tentang Androgafolid	11

2.2.1 Sifat Fisika Kimia Androgafolid	11
2.2.2 Bioaktivitas Androgafolid	12
2.3 Tinjauan Tentang Toksisitas	13
2.3.1 Tujuan Studi Toksisitas	13
2.3.2 macam Studi Toksisitas	14
2.4 Tinjauan Tentang Hati	22
2.4.1 Anatomi Hati	22
2.4.2 Fisiologi Hati	23
2.4.3 Histologi Hati	24
2.4.4 Histopatologi Hati	26
2.5 Tinjauan Tentang Ginjal	29
2.5.1 Anatomi Ginjal	29
2.5.2 Fisiologi Ginjal	30
2.5.3 Histologi Ginjal	32
2.5.4 Histopatologi Ginjal	33
2.6 Tinjauan Tentang hewan Coba	35
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	38
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Bahan Penelitian	41
4.1.1 Bahan Uji	41
4.1.2 Bahan Kimia	41
4.1.3 Hewan Percobaan	41
4.2 Alat	41

4.3 Metode Penelitian	42
4.3.1 Rancangan Penelitian	42
4.3.2 Penyiapan Hewan Uji	43
4.3.3 Penentuan Dosis	43
4.3.4 Penyiapan Bahan Uji	44
4.3.5 Pengumpulan Data	45
4.3.6 Analisis Data	46
4.3.7 Pembuatan Preparat Histopatologi	47
4.3.8 Skema Kerja	50
BAB V HASIL PENELITIAN	
5.1 Perhitungan Dosis	51
5.2 Data hasil Penelitian	51
5.2.1 Hasil Pengamatan Kematian Hewan Uji	52
5.2.2 Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas	52
5.2.4 Hasil Pengamatan Berat Badan	42
5.2.5 Hasil Pengamatan Berat Relatif Organ	56
5.2.6 hasil Pengamatan Histopatologi Hati	57
5.2.7 Hasil Pengamatan Histopatologi Ginjal	61
BAB VI PEMBAHASAN	64
BAB III KESIMPULAN DAN SARAN	74
DAFTAR PUSTAKA	75

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Andrographis paniculata</i> Nees	8
Gambar 2.2 Struktur Kimia <i>Andrographis</i>	12
Gambar 2.3 Struktur Histologi Hati Tikus.....	26
Gambar 2.4 Pembengkakan Sel Hati Disertai vakuolisasi.....	27
Gambar 2.5 Degenerasi Melemak pada Sebagian Sel Hati.....	28
Gambar 2.6 Degenerasi Melemak pada Seluruh Sel Hati.....	28
Gambar 2.7 Gambaran Histologi Korteks Ginjal.....	33
Gambar 2.8 Edema Glomerulus pada Ginjal Tikus	35
Gambar 2.9 Potongan Melintang Ginjal Tikus	35
Gambar 2.10 <i>Rattus norvegicus</i>	36
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual.....	40
Gambar 4.1 Skema Kerja.....	51
Gambar 5.1 Grafik Rata-rata Berat Badan Tikus Tiap Kelompok.....	55
Gambar 5.2. Hasil Pengamatan Histologi Hati	60
Gambar 5.3 Hasil Pengamatan Histologi Ginjal.....	63

DAFTAR TABEL

Tabel II.1 Kriteria Penggolongan Sediaan Uji.....	16
Tabel IV.1 Parameter Perubahan Histopatologi Organ.....	47
Tabel V.1 Perhitungan Dosis Fraksi	51
Tabel V.2 Hasil Pengamatan Kematian Hewan Uji.....	52
Tabel V.3 Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas pada Tikus pada 4 jam ...	52
Tabel V.4 Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas pada Tikus pada 24 jam .	53
Tabel V.5 Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas pada Tikus pada 48 jam .	54
Tabel V.6 Hasil Pengamatan Perubahan Berat Badan Tikus	56
Tabel V.7 Hasil Analisis Berat Relatif Organ.....	57
Tabel V.8 Hasil Pengamatan Kongesti Vena Centralis	58
Tabel V.9 Hasil Pengamatan Dilatasi Sinusoid	58
Tabel V.10 Hasil Pengamatan Sel Hati yang mengalami Oedema	59
Tabel V.11 Hasil Pengamatan <i>Granular Cast</i>	61
Tabel V.12 Hasil Pengamatan <i>Cellular Cast</i>	62
Tabel V.13 Hasil Pengamatan Degenerasi Hidrofik	62

DAFTAR LAMPIRAN

1.	Keterangan Laik Etik.....	81
2.	Perhitungan Dosis Androgafolid	82
3.	Gambar Proses Pemberian Bahan Uji.....	83
4.	Tabel Konversi Dosis	84
5.	Volume Maksimum Obat yang Diberikan Hewan Coba	85
6.	Data Survival Rate Tikus.....	86
7.	Hasil pengamatan Gejala Toksisitas	88
8.	Tabel Kategori Toksisitas akut berdasarkan LD ₅₀	94
9.	Data Berat Relatif Organ	95
10.	Uji Normalitas Data Berat Organ Relatif Hati dan Ginjal	96
11.	Analisis <i>one way</i> anova data berat organ relatif Hati	99
12.	Analisis <i>one way</i> anova data berat organ relatif Ginjal	100
13.	Hasil scoring histopatologi hati	101
14.	Analisis Kruskal-Wallis Histopatologi Hati	102
15.	Hasil scoring histopatologi ginjal	105
16.	Analisis Kruskal-Wallis Histopatologi Ginjal	106
17.	Hasil Pengamatan berat badan tikus.....	110
18.	Uji Normalitas Perubahan Berat Badan Tikus.....	112
19.	Analisis <i>One way</i> Anova Berat Badan Tikus.....	113

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Obat tradisional dan pengobatan alternatif telah digunakan secara luas untuk pencegahan, diagnosis dan perawatan terhadap berbagai macam penyakit (Humber, 2002). Obat tradisional khususnya obat herbal dikenal sebagai bentuk pengobatan alternatif yang mulai umum digunakan yaitu sekitar 60% oleh penduduk dunia, baik di negara maju maupun negara berkembang yang sebelumnya lebih dominan menggunakan obat-obatan modern (Oghbonnia *et al.*, 2008).

Indonesia merupakan salah satu negara yang terkenal dengan keanekaragaman flora. Bangsa Indonesia telah lama mengenal dan menggunakan tanaman berkhasiat obat sebagai salah satu upaya dalam menanggulangi masalah kesehatan. Pengetahuan tanaman berkhasiat obat ini berdasar pada pengalaman dan keterampilan yang secara turun temurun telah diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya (Sukandar, 2006). Zuhud *et al.*, 2001 mengidentifikasi terdapat 1845 spesies di hutan Indonesia yang memiliki potensi sebagai obat. Sedangkan menurut Elfahmi *et al.* Tahun 2014 PT Eisei pada tahun 1995 menerbitkan Kamus Obat Herbal Indonesia berisi lebih dari 2500 jenis tanaman yang dapat dikembangkan untuk tujuan pengobatan. Angka-angka ini berpotensi untuk berubah karena masih banyak spesies yang belum diidentifikasi. Menurut Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM), 283 spesies tanaman telah resmi terdaftar sebagai obat, sisanya sebagian besar masih digunakan secara tradisional (Elfahmi *et al.*, 2014).

WHO merekomendasikan penggunaan obat tradisional termasuk obat herbal untuk digunakan sebagai pemeliharaan kesehatan di masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit terutama untuk penyakit kronis, penyakit degeneratif dan kanker. Hal ini menunjukkan dukungan WHO untuk *back to nature* yang dalam hal tertentu lebih menguntungkan. Untuk meningkatkan selektivitas pengobatan dan mengurangi pengaruh musim dan tempat asal tanaman terhadap efek, serta lebih memudahkan dalam standardisasi bahan obat, maka zat aktif diekstraksi lalu dibuat sediaan fitofarmaka atau bahkan dimurnikan sampai diperoleh zat murni. Karena banyaknya variasi sediaan bahan alam maka untuk memudahkan pengawasan dan perizinan maka Badan POM mengelompokkan dalam sediaan jamu, sediaan herbal terstandar dan sediaan fitofarmaka. Persyaratan ketiga sediaan berbeda, yaitu untuk jamu pemakaiannya secara empirik berdasarkan pengalaman, sediaan herbal terstandar yaitu bahan bakunya harus distandardisasi dan sudah diuji farmakologi secara eksperimental sedangkan sediaan fitofarmaka sama dengan obat modern bahan bakunya harus distandardisasi dan harus melalui uji klinik (Sukandar, 2006).

Andrographis paniculata Nees atau oleh masyarakat Indonesia dikenal dengan nama sambiloto merupakan tanaman obat yang penting dan digunakan secara luas di seluruh dunia. Selama berabad-abad tanaman ini telah digunakan secara efektif sebagai obat tradisional di wilayah Asia. Bagian-bagian tanaman yang digunakan sebagai obat mengandung sejumlah senyawa kimia yang sangat besar. Kandungan senyawa yang utama diantaranya adalah lakton, diterpenoid, glikosida diterpen, flavonoid dan glikosida flavonoid (Akbar, 2011). Begitu pula

menurut Matsuda *et al.*, 1994, Chan *et al.*, 1971, dan Kuroyanagi *et al.*, 1987 (dalam Dua *et al.*, 2004) banyak diterpenoid, glukosida, dan derivat flavon telah diisolasi dari *Andrographis paniculata* dan telah teruji memiliki banyak aktivitas biologis.

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) telah dilaporkan memiliki efek farmakologi yang luas yaitu sebagai antikanker, anti-diare, anti-hepatitis, anti-HIV, antihiperglikemi, antiinflamasi, antimikroba, antimalaria, antioksidan, efek pada kardiovaskular, sitotoksik, hepatoprotektor, imunostimulator dan disfungsi seksual (Hossain *et al.*, 2014).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rahman dan Mishra menunjukkan bahwa ekstrak *Andrographis Paniculata* memiliki aktivitas sebagai antimalaria melalui uji secara *in vitro* maupun *in vivo*. Ekstrak metanol dari *Andrographis paniculata* mampu menghambat aktivitas malaria oleh *Plasmodium falciparum* dengan nilai IC_{50} sebesar 7.2 $\mu\text{g/ml}$ (Rahman, 1999; Mishra *et al.*, 2009). Salah satu senyawa aktif dari *Andrographis paniculata* yaitu androgafolida yang merupakan kandungan utama dari tanaman ini dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antimalaria dengan nilai IC_{50} sebesar 9.1 μM . Sehingga androgafolida dianggap sebagai senyawa aktif dan memiliki aktivitas antimalaria yang baik berdasarkan IC_{50} yang nilainya kurang dari 20 μM (Mishra *et al.*, 2011).

Berkenaan dengan potensi yang dimiliki sambiloto sebagai antimalaria, Widyawaruyanti *et al.* melakukan pengembangan produk fitofarmaka dari ekstrak etanol 96% herba sambiloto yang kemudian difraksinasi menggunakan etil asetat sehingga disebut sebagai fraksi etil asetat-96. Fraksi etil asetat yang diperoleh menunjukkan aktivitas

antimalaria *in vivo* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* (Widyawaruyanti *et al.*, 2011). Senyawa utama dari tanaman ini adalah androgafolida. Androgafolida berbentuk kristal tidak berwarna dari senyawa diterpen lakton yang merupakan salah satu senyawa yang mempunyai peran terhadap aktivitasnya sebagai antimalaria pada tanaman *Andrographis paniculata*. Penelitian ini juga menyebutkan bahwa fraksi etil asetat yang dikembangkan sebagai produk fitofarmaka ini mengandung senyawa marker androgafolida yang pada dosis 20.1 mg/kg BB mencit perhari menunjukkan aktivitasnya dalam menghambat *Plasmodium berghei* (Widyawaruyanti *et al.*, 2014). Berdasarkan potensi yang dimiliki fraksi tersebut, maka dilakukan studi formulasi dan produksi tablet dari fraksi etil asetat-96 herba sambiloto sebagai antimalaria yang dilanjutkan dengan penentuan dosis efektif dan kemanannya sebagai obat fitofarmaka. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji keamanan terhadap tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto.

Dari segi efek samping memang diakui bahwa obat tradisional memiliki efek samping relatif kecil dibandingkan dengan obat modern, tetapi perlu diperhatikan bila ditinjau dari kepastian bahan aktif dan konsistensinya yang belum dijamin terutama untuk penggunaan secara rutin (Katno dan Pramono, 2007). Untuk itu perlu dilakukan penelitian untuk dapat membuktikan dan menjamin efektifitas serta keamanan dari tanaman obat.

Salah satu alasan meningkatnya ketertarikan pada penggunaan obat herbal adalah obat herbal dipercaya penggunaannya karena merupakan produk alam dan telah digunakan secara tradisional, aman dan tidak berbahaya. Namun, produk yang asli dari alam ini

belum dijamin keamanannya, seperti banyak yang telah diutarakan bahwa masih diperlukan perhatian terhadap resiko penggunaan obat herbal. Oleh karena itu sangat penting mengetahui keamanan sambiloto sebagai pengobatan sebelum dilakukan pengembangan obat herbal yang lebih jauh. Menindaklanjuti penelitian yang dilakukan sebelumnya, yaitu tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto yang dikembangkan menjadi produk fitofarmaka sebagai antimalaria, selain harus melalui uji efektifitas, harus melalui uji keamanan. sehingga perlu dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui keamanannya (Arsad *et al.*, 2013).

Efek toksik mula-mula dapat terjadi karena terdapat ikatan antara toksikan dengan sel-sel organ vital seperti hati dan ginjal. oleh karena itu, mengevaluasi efek toksik suatu zat pada kedua organ tersebut merupakan hal yang sangat penting untuk melindungi kesehatan masyarakat karena pemaparan suatu zat toksik dapat membahayakan tubuh dan menghasilkan efek samping yang serius pada manusia (Asante, 2002). Menurut BPOM tahun 2014, bahaya akibat pemaparan suatu zat pada manusia dapat diketahui dengan mempelajari efek kumulatif, dosis yang dapat menimbulkan efek toksik pada manusia, efek karsinogenik, teratogenik, mutagenik, dan lain-lain. Pada umumnya informasi tersebut dapat diperoleh dari percobaan menggunakan hewan uji sebagai model yang dirancang pada serangkaian uji toksisitas (BPOM, 2014). Pada penelitian ini akan dilakukan uji toksisitas akut terhadap nilai LD_{50} untuk mengetahui dosis penggunaan yang aman dan gambaran histopatologi dari dua organ vital yaitu hati dan ginjal untuk mengetahui derajat kerusakan organ akibat pemakaian obat dengan dosis tinggi.

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto menyebabkan efek toksik akut pada hati tikus wistar jantan?
2. Apakah tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto menyebabkan efek toksik akut pada ginjal tikus wistar jantan?.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui efek toksisitas akut yang timbul setelah pemberian tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui bahwa tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto tidak menyebabkan efek toksik akut pada hati tikus wistar jantan
2. Mengetahui bahwa tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto tidak menyebabkan efek toksik akut pada ginjal tikus wistar jantan

1.4. Hipotesis

1. Tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto tidak menyebabkan efek toksik akut pada hati tikus wistar jantan
2. Tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto tidak menyebabkan efek toksik akut pada ginjal tikus wistar jantan.

1.5. Manfaat Penelitian

Dengan mengetahui keamanan dan informasi toksisitas akut tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto pada hati dan ginjal tikus wistar jantan, diharapkan dapat digunakan sebagai data pendukung dalam pengembangan tanaman *Andrographis paniculata* Nees sebagai obat fitofarmaka.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang *Andrographis paniculata* Nees

2.1.1. Taksonomi Tanaman *Andrographis paniculata* Nees

Secara taksonomi menurut Siavananthan dan Elamaram (2013), Sambiloto dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Personales
Famili	: Acanthaceae
Genus	: <i>Andrographis</i>
Spesies	: <i>Andrographis paniculata</i> Nees

2.1.2. Sinonim

Sinonim *Andrographis paniculata* Nees adalah sebagai berikut (Wijayakusuma, 1996):

- Justicia paniculata* Nees
- Justicia latreosa* Russ
- Justicia stricta* Lamk

2.1.3. Nama Daerah Tanaman

Jawa : Bidara, Sadilata, Sambilata, Takila (Heyne, 1987)

Sunda : Ki oray, Ki peurat, Takilo

Sumatra : Papaitan, Pepaitan

(Depkes RI, 1979).

2.1.4. Morfologi Sambiloto

Sambiloto merupakan tumbuhan berkhasiat obat berupa tera tegak yang tingginya bisa mencapai 90 sentimeter. Asalnya diduga dari Asia tropika. Penyebarannya dari India meluas ke selatan sampai di Siam, ke timur sampai Semenanjung Malaya, kemudian ditemukan di Jawa. Tumbuh baik di daratan rendah sampai ketinggian 700 meter dari permukaan laut. Sambiloto dapat tumbuh baik pada curah hujan 2000-3000 mm/tahun dan suhu udara 25-32 derajat Celcius. Kelembaban yang dibutuhkan termasuk sedang, yaitu 70-90% dengan penyinaran agak lama (Mahendra, 2005).



Gambar 2.1 *Andrographis paniculata* Nees.

sambiloto merupakan herba tahunan, semua bagiannya terasa sangat pahit. Tanaman ini tumbuh banyak di Asia Tenggara

seperti di India, Sri Lanka, Pakistan, Malaysia, Indonesia, dan dibudidayakan secara luas di India, Cina dan Tailand (Jarukamjorn dan Nemoto, 2008). Sambiloto merupakan herba semusim, tinggi 50-90 cm. Batang berkayu disertai banyak cabang berbentuk segiempat (kwardangular). Pada saat masih muda dan saat tua berbentuk bulat. Daun tunggal, berbentuk lanset, bertangkai pendek ± 30 mm, letak bersilang berhadapan, pangkal meruncing, tepi rata, permukaan atas hijau tua, bagian bawah hijau muda, panjang 2-8 cm, lebar 1-3 cm, pertulangan menyirip. Memiliki bunga majemuk dengan perbandingan *rasemosa*

yang bercabang membentuk malai keluar dari ujung batang atau ketiak daun. Kelopak berbentuk bulat panjang, kepala sari bulat, berwarna ungu, putih pendek, kepala putik berwarna ungu kecoklatan, mahkotanya lonjong, pangkal berlekatan, ujung pecah menjadi empat, bagian dalam putih bernoda ungu, dan bagian luar berambut merah. Buah berbentuk kotak bulat panjang, tengah beralur, ujungnya runcing, panjang sekitar 1,5 cm, lebar 0,5 cm, pangkal dan ujungnya tajam, saat masih muda berwarna hijau, setelah tua berwarna hitam, bila masak buah akan pecah membujur menjadi empat keping. Biji gepeng kecil-kecil, berwarna coklat muda. Perbanyakkan dengan stek biji atau stek batang (Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991). Tanaman ini dapat tumbuh hingga mencapai kira-kira 30-110 cm pada daerah yang teduh dan lembab (Jarukamjorn dan Nemoto, 2008).

2.1.5. Kandungan Kimia Sambiloto

Andrographis paniculata (Burm. f.) Nees mengandung diterpen dan flavonoid. flavonoid banyak terdapat pada akar tapi juga bisa diisolasi dari daun. Herba sambiloto mengandung alkana, keton dan aldehyd. Beberapa jenis diterpen telah teridentifikasi dalam herba sambiloto diantaranya yaitu deoksiandrografolid, andrografolid, neoandrografolid, 14-deoksi-11-12-didehidroandrografolid, 12-dehidroandrografolid, isoandrografolid dan 3,19-dihydroxy-15-methoxy-entlabda-8(17),11,13-trien-16,15-olide. Beberapa jenis flavonoid yaitu dihydroxydimethoxyflavone; 5,4'-dihydroxy-7,8-dimethoxyflavone; apigenin-7-O- β -D-glucoronide dan 5,4'-dihydroxy-7-methoxy-8-O- β -D-glucopyranosylflavone teridentifikasi dari seluruh bagian tanaman (Song *et al.*, 2013).

Komponen bioaktif utama dan paling banyak kandungannya dari tanamanobat *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees adalah andrografolid. Komponenini dapat ditemukan di semua bagian tanaman, terutama pada bagian daun. Didalam daun, kadar senyawa andrografolida sebesar 2,5-4,8% dari berat keringnya (Prapanza dan Marianto, 2003).

2.1.6. Kegunaan Sambiloto

A. paniculata telah disebutkan memiliki efek farmakologi yang luas yaitu sebagai antikanker (Harjotaruno, 2008), antidiare (Gupta *et al.*, 1993), antihepatitis (Tang *et al.*, 1992), anti-HIV (Nanduri *et al.*, 2004), antihiperqlikemi (Subramanian

et al., 2008), antiinflamasi (Sheeja *et al.*, 2006), antimikroba, anti malaria (Widyawaruyanti *et al.*, 2014), antioksidan (Akowuah *et al.*, 2008), efek pada kardiovaskular (Tan *et al.*, 2004), sitotoksik (Nanduri *et al.*, 2004), hepatoprotektor (Visen *et al.*, 2007), imunostimulator (Iruretagoyana *et al.*, 2005) dan disfungsi seksual (Akbarsha dan Murugaian, 2000).

Daun dan akar *A. paniculata* selama berabad-abad telah digunakan di Asia dan Eropa untuk mengobati berbagai macam penyakit. Namun, semua bagian tanaman dari sambiloto juga dapat digunakan untuk tujuan tertentu. Berkenaan dengan dimilikinya aktivitas sebagai *cold property*, sambiloto dianjurkan untuk digunakan sebagai penurun panas dan menghilangkan racun dari dalam tubuh. Tanaman ini juga direkomendasikan untuk digunakan pada beberapa kasus seperti lepra, *gonorrhoea*, skabies, *skin eruptions*, dan efek sebagai *blood purifying* pada demam kronik maupun demam musiman (Akbar, 2011).

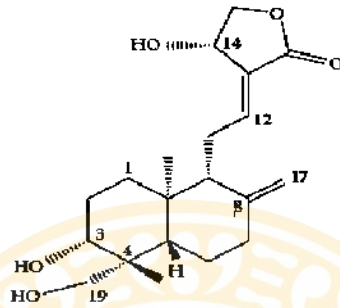
Selain itu, Wijayakusuma *et al.* tahun 1994 menyatakan bahwa daun sambiloto dapat merusak sel *trophocyt* dan *trophoblast*, berperan pada kondensasi sitoplasma dari sel tumor, piknosis, dan menghancurkan inti sel.

2.2. Tinjauan Tentang Androgafolida

2.2.1. Sifat Fisika dan Kimia Androgafolida

Rumus molekul androgafolida adalah $C_{20}H_{30}O_5$ dengan berat molekul sebesar 360,46 g/mol. Androgafolida berbentuk kristal, tidak berwarna, larut dalam metanol, etanol, aseton,

piridin, etil asetat, dan kloroform, namun sedikit larut dalam air dan tidak larut dalam dietil eter (Wongkittipong *et al.*, 2000).



Gambar 2.2 Struktur Kimia Andrografolida

Andrografolida, komponen utama daun sambiloto memiliki stabilitas tergantung pada bentuk kristalnya. Degradasi andrografolida terjadi karena adanya reaksi hidrolisis sehingga cincin lakton menjadi terbuka. Sifat fisika dari Andrografolida adalah sebagai berikut: titik leleh 228-230⁰C, spektrum ultraviolet dalam etanol λ maskimal 223nm (Kumoro, 2007).

2.2.2. Bioaktivitas Andrografolida

Andrografolida merupakan komponen bioaktif utama dari tanaman obat sambiloto *Andrographis paniculata* Nees. Komponen ini dapat ditemukan di semua bagian tanaman terutama pada bagian daun. Di dalam daun, kadar senyawa andrografolida sebesar 2,5-4,8% dari berat keringnya (Prapanza dan Marianto, 2003).

Andrografolida memiliki banyak khasiat dalam dunia kesehatan karena memiliki berbagai aktivitas farmakologi seperti menurunkan kadar gula darah, trigliserida dan LDL, antiinflamasi vaskuler untuk mencegah aterosklerosis, antioksidan dan analgesik (Nugroho *et al.*, 2012; Azlan *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2009).

Andrografolida, neoandrografolida, deoksi-andrografolid dan andrografisid yang diisolasi dari daun *Andrographis paniculata* menunjukkan aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium berghei* NK65 pada *Mastomys natalensis* (Dua, *et al.*, 2004).

2.3. Tinjauan Tentang Toksisitas

2.3.1. Tujuan studi Toksisitas

Uji toksisitas adalah suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis-respon yang khas dari sediaan uji. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberi informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji tersebut bila terjadi pemaparan pada manusia, sehingga dapat ditentukan dosis penggunaannya demi keamanan manusia (BPOM, 2014).

Uji toksisitas menggunakan hewan uji sebagai model berguna untuk melihat adanya reaksi biokimia, fisiologik dan patologik pada manusia terhadap suatu sediaan uji. Hasil uji toksisitas tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan suatu bahan/ sediaan pada manusia, namun dapat memberikan petunjuk adanya toksisitas relatif dan

membantu identifikasi efek toksik bila terjadi pemaparan pada manusia . Manfaat yang diperoleh antara lain adalah; Mengetahui gejala-gejala yang timbul akibat pemberian obat, mengetahui batas keamanan obat dan mengetahui derajat kematian hewan coba akibat pemberian obat (BPOM, 2014).

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

2.3.2. Macam Studi Toksisitas

2.3.2.1. Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji yang diberikan secara oral dalam dosis tunggal, atau dosis berulang yang diberikan dalam waktu 24 jam. Prinsip uji toksisitas akut oral yaitu sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok, kemudian dilakukan pengamatan terhadap adanya efek toksik dan kematian. Hewan yang mati selama percobaan dan yang hidup sampai akhir percobaan diotopsi untuk dievaluasi adanya gejala-gejala toksisitas (BPOM, 2014).

Prinsip toksisitas akut yaitu pemberian secara oral suatu zat dalam beberapa tingkatan dosis kepada beberapa kelompok hewan uji. Penilaian toksisitas akut ditentukan dari kematian hewan uji sebagai parameter akhir. Hewan yang mati selama percobaan dan yang hidup sampai akhir percobaan diotopsi untuk dievaluasi adanya gejala-gejala toksisitas dan selanjutnya dilakukan pengamatan secara makroskopik pada setiap organ (BPOM, 2014)

Tujuan uji toksisitas akut oral adalah untuk mendeteksi toksisitas intrinsik suatu zat, menentukan organ sasaran, kepekaan spesies, memperoleh informasi bahaya setelah pemaparan suatu zat secara akut, memperoleh informasi awal yang dapat digunakan untuk menetapkan tingkat dosis, merancang uji toksisitas selanjutnya, memperoleh nilai LD₅₀ suatu bahan/ sediaan, serta penentuan penggolongan bahan/ sediaan dan pelabelan (BPOM, 2014).

LD₅₀ merupakan dosis tunggal suatu zat yang secara statistik diharapkan akan membunuh 50% hewan coba. Nilai LD₅₀ berguna untuk mengklasifikasikan zat kimia sesuai dengan efek toksik yang timbul, mengevaluasi efek keracunan yang tidak disengaja, perencanaan penelitian toksisitas subakut dan kronik pada hewan, memberikan informasi tentang mekanisme toksisitas, pengaruh umur, seks, faktor individu, faktor lingkungan, variasi respon antar spesies dan antar strain hewan, memberikan informasi tentang reaktifitas suatu

populasi hewan, memberikan informasi yang dibutuhkan dalam pengujian obat pada manusia dan dalam pengendalian mutu zat kimia dan deteksi pencemaran toksik serta perubahan fisik yang mempengaruhi bioavailabilitas (Lu, 1995).

Untuk obat, obat tradisional dan bahan lainnya (*Generally Recognized As Safe/GRAS*) seperti bahan pangan, penentuan kategori toksisitas akut digunakan penggolongan klasifikasi seperti pada tabel II.1.

Tabel II.1 Kriteria Penggolongan Sediaan Uji

Tingkat toksisitas	LD50 oral (pada tikus)	Klasifikasi
1 r	≤ 1 mg/kg	Sangat toksik
2 u	1-50 mg/kg	Toksik
3 t	50-500 mg/kg	Toksik sedang
4 n	500-5000 mg/kg	Toksik ringan
5	5-15 g/kg	Praktis tidak toksik
6 e	≥ 15 g/kg	Relatif tidak membahayakan

efek yang timbul setelah pemberian bahan uji segera diamati agar saat timbulnya tanda dan gejala-gejala maupun saat datangnya kematian atau kesembuhan dari gejala-gejala yang ada secara tepat dapat dicatat (Lu, 1995). Pengamatan tanda-tanda toksisitasnya, antara lain (Loomis, 1978): 1. Autonomik seperti hipersekreasi

hidung, salivasi, diare, keluar air seni; 2. Perilaku, seperti sedasi, gelisah, posisi duduk kepala diatas, sering menjilat-jilat tubuh, terengah-engah, sikap agresif atau defensif; 3. Sensorik, seperti peka terhadap nyeri, peka terhadap bunyi dan sentuhan; 4. Sensorik seperti tremor, lemas, ekor melengkung keatas membentuk huruf S; 5. Kardiovaskuler seperti denyut jantung meningkat atau berkurang; 6. Mata , seperti midriasis, miosis; 7. Kulit seperti menggigil, edema, bengkak.

Autopsi kasar perlu dilakukan pada semua hewan yang mati dan pada beberapa hewan yang hidup, terutama hewan yang tampak sakit pada akhir percobaan. Autopsi dapat memberikan informasi yang berharga tentang organ sasaran, terutama bila kematian tidak terjadi segera setelah pemberian zat. Mungkin juga diperlukan pemeriksaan histopatologik organ tubuh dan jaringan tertentu (Loomis, 1978).

2.3.2.2. Uji Toksisitas Subkronis Oral

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 (BPOM, 2014).

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 efek tertunda atau efek yang bersifat *reversible*. Selama waktu pemberian sediaan uji, hewan harus diamati setiap hari untuk menentukan adanya toksisitas (BPOM, 2014).

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).

2.3.2.3. Uji Toksisitas Kronis Oral

Uji toksisitas kronis oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji secara berulang sampai seluruh umur hewan. Tujuannya adalah untuk mengetahui profil efek toksik setelah pemberian sediaan uji secara berulang selama waktu yang panjang, untuk menetapkan tingkat dosis yang tidak menimbulkan efek toksik (*NOAEL*). Uji toksisitas kronis harus dirancang sedemikian rupa sehingga dapat diperoleh informasi toksisitas secara

umum meliputi efek neurologi, fisiologi, hematologi, biokimia klinis, dan histopatologi (BPOM, 2014).

2.3.2.4. Uji Teratogenisitas

Uji teratogenisitas adalah suatu pengujian untuk memperoleh informasi adanya abnormalitas fetus yang terjadi karena pemberian sediaan uji selama masa pembentukan organ fetus (masa organogenesis). Informasi tersebut meliputi abnormalitas bagian luar fetus (morfologi), jaringan lunak serta kerangka fetus (BPOM, 2014).

2.3.2.5. Uji Sensitisasi Kulit

Uji sensitisasi kulit adalah suatu pengujian untuk mengidentifikasi suatu zat yang berpotensi menyebabkan sensitisasi kulit. Prinsip uji sensitisasi kulit adalah hewan uji diinduksi dengan dan tanpa *Freund's Complete Adjuvant (FCA)* secara injeksi intradermal dan topikal untuk membentuk respon imun, kemudian dilakukan ujiantang (*challenge test*). Tingkat dan derajat reaksi kulit dinilai berdasarkan skala *Magnussin* dan *Kligman* (BPOM, 2014).

2.3.2.6. Uji Iritasi Mata

Uji iritasi mata adalah suatu uji pada hewan uji (kelinci albino) untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemaparan sediaan uji pada mata. Prinsip

uji iritasi mata adalah sediaan uji dalam dosis tunggal dipaparkan ke dalam salah satu mata pada beberapa hewan uji dan mata yang tidak diberi perlakuan digunakan sebagai kontrol. Derajat iritasi/ korosi dievaluasi dengan pemberian skor terhadap cedera pada konjungtiva, kornea, dan iris pada interval tertentu. Tujuan uji iritasi mata adalah untuk memperoleh informasi adanya kemungkinan bahaya yang timbul pada saat sediaan uji terpapar pada mata dan membran mukosa mata (BPOM, 2014).

2.3.2.7. Uji Iritasi Akut Dermal

Uji iritasi akut dermal adalah suatu uji pada hewan (kelinci albino) untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemaparan sediaan uji pada dermal selama 3 menit sampai 4 jam. Tujuan uji iritasi akut dermal adalah untuk menentukan adanya efek iritasi pada kulit serta untuk menilai dan mengevaluasi karakteristik suatu zat apabila terpapar pada kulit (BPOM, 2014).

2.3.2.8. Uji Iritasi Mukosa Vagina

Uji iritasi mukosa vagina adalah suatu uji yang digunakan untuk menguji sediaan uji yang kontak langsung dengan jaringan vagina dan tidak dapat diuji dengan cara lain. Tujuan uji iritasi mukosa vagina adalah untuk mengevaluasi keamanan dari alat-alat kesehatan yang kontak dengan mukosa vagina (BPOM, 2014).

2.3.2.9. Uji Toksisitas Akut Dermal

Uji toksisitas akut dermal adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemaparan suatu sediaan uji dalam sekali pemberian melalui rute dermal. Tujuan uji toksisitas akut dermal adalah untuk mendeteksi toksisitas intrinsik suatu zat, memperoleh informasi bahaya setelah pemaparan suatu zat melalui kulit secara akut, dan untuk memperoleh informasi awal yang dapat digunakan untuk menetapkan tingkat dosis dan merancang uji toksisitas selanjutnya serta untuk menetapkan nilai LD50 suatu zat, penentuan penggolongan zat, menetapkan informasi pada label dan informasi absorpsi pada kulit (BPOM, 2014).

2.3.2.10. Uji Toksisitas Subkronis Dermal

Uji toksisitas subkronis dermal adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang yang diberikan melalui rute dermal pada hewan uji selama sebagian umur hewan, tetapi tidak boleh lebih dari 10% seluruh umur hidup hewan. Pada akhir periode pemberian sediaan uji, semua hewan yang masih hidup diotopsi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makroskopik pada setiap organ maupun jaringan, serta dilakukan pemeriksaan hematologi, biokimia klinis, histopatologi. Tujuan uji toksisitas subkronis dermal adalah untuk

mendeteksi efek toksik zat yang belum terdeteksi pada uji toksisitas akut dermal, mendeteksi efek toksik setelah pemaparan sediaan uji melalui kulit secara berulang dalam jangka waktu tertentu, mempelajari adanya efek kumulatif dan efek reversibilitas setelah pemaparan sediaan uji mekukan secara berulang dalam jangka waktu tertentu (BPOM, 2014).

2.3. Tinjauan Tentang Hati

2.3.1. Anatomi Hati

Hati tikus memiliki empat lobus yaitu lobus kiri, lobus kanan, lobus tengah, dan kaudal. Lobus kiri dan lobus tengah membentuk lobus tunggal namun lobus tengah memiliki posisi yang lebih dalam yang dikelilingi oleh ligamen yang mengikatnya. Lobus kanan terbagi menjadi dua sub-lobus dan lobus kaudal terbagi menjadi dua yaitu bagian *paracavadan* lobus *Spiegel* yang juga terbagi menjadi dua sub-lobus. Lobus kiri, lobus kanan, dan lobus kaudal mempunyai satu cabang portal primer sedangkan lobus tengah mempunyai dua cabang portal. Lobus kiri, sub-lobus kanan, dan lobus kaudal masing-masing memiliki satu vena hepatika yang besar, sedangkan lobus tengah memiliki tiga vena hepatika yang besar. Berdasarkan susunan percabangan dari vena porta dan vena hepatika, lobus tengah dari hati tikus memiliki komponen hepatic kanan dan kiri serta celah portal yang utama (Koquire, 1999)

Didalam lobus mengalir darah yang melewati sel-sel hati melalui sinuosid dari cabang vena porta hepatika ke dalam vena

sentralis tiap lobulus (Ganong, 2003). Setiap lobulus hati terdiri dari beberapa komponen, yaitu sel-sel hati (hepatosit), vena sentralis, sinusoid, cabang-cabang vena porta, cabang-cabang arteri hepatica, sel kuppfer dan kanalikuli biliaris (Handoko, 2003). Vena porta, arteri hepatica dan saluran empedu akan bergabung dalam satu darah venaporta (segitiga Kiernaan). Empedu akan disalurkan dari hati ke duodenum melalui saluran empedu intrahepatik dan ekstrahepatik. Didalam hati juga ditemukan banyak sel-sel RES (*ReticuloEndothelial System*), yakni sel-sel Kupffer yang terdapat dalam dinding-dinding kapiler dan sinusoid-sinusoid hati, berfungsi untuk membersihkan benda-benda asing dari darah (fagositik) (Ganong, 2003).

2.3.2. Fisiologi Hati

Menurut Guyton dan Hall (2008), hati mempunyai beberapa fungsi yaitu: a. Metabolisme karbohidrat, fungsi hati dalam metabolisme karbohidrat adalah menyimpan glikogen dalam jumlah besar, mengkonversi galaktosa dan fruktosa menjadi glukosa, glukoneogenesis, dan membentuk banyak senyawa kimia yang penting dari hasil perantara metabolisme karbohidrat; b. Metabolisme lemak, fungsi hati yang berkaitan dengan metabolisme lemak, antara lain: mengoksidasi asam lemak untuk mensuplai energi bagi fungsi tubuh yang lain, membentuk sebagian besar kolesterol, fosfolipid dan lipoprotein, membentuk lemak dari protein dan karbohidrat; c. Metabolisme protein, fungsi hati dalam metabolisme protein adalah deaminasi asam amino, pembentukan ureum untuk

mengeluarkan amonia dari cairan tubuh, pembentukan protein plasma, dan interkonversi beragam asam amino dan membentuk senyawa lain dari asam amino; d. Fungsi lain, fungsi hati yang lain diantaranya hati merupakan tempat penyimpanan vitamin, hati sebagai tempat menyimpan besi dalam bentuk ferritin, hati membentuk zat-zat yang digunakan untuk koagulasi darah dalam jumlah banyak dan hati mengeluarkan atau mengekskresikan obat-obatan, hormon dan zat lain.

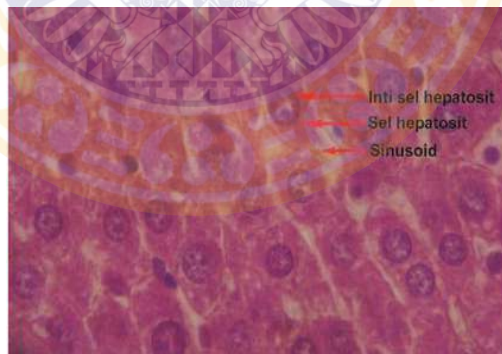
2.3.3. Histologi Hati

Sel-sel yang terdapat di hati antara lain: hepatosit, sel endotel, dan sel makrofag yang disebut sebagai sel kuppfer dan sel ito (sel penimbun lemak). Sel hepatosit berderet secara radier dalam lobulus hati dan membentuk lapisan sebesar 1-2 sel serupa dengan susunan bata. Lempong sel ini mengarah dari tepian lobulus seperti labirin dan busa. Celah diantara lempeng-lempeng ini mengandung kapiler yang disebut sinusoid hati (Janquiera *et al.*, 2007).

Sel hati (hepatosit) berbentuk polihedral, berdiameter 20-25 μm pada hewan dewasa, sedangkan pada hewan muda sekitar 2-7 μm . Inti bulat ditengah tengah dan kadang-kadang tampak lebih dari satu inti akibat pembelahan sitoplasma yang tidak sempurna (Hartono, 1992). Hepatosit tersusun radial di sekeliling vena sentralis. Diantara sederetan hepatosit terdapat suatu saluran sinusoid yang menuju vena sentralis. saluran ini merupakan sistem sinusoidal, yang membawa darah dari

pembuluh portal menuju vena sentralis dan pembuluh empedu. Lobus hati secara histologis dibungkus oleh kapsula. Kapsula lobus hati terdiri dari kapsula fibrosa dan kapsula serosa (Harada *et al.*, 1999).

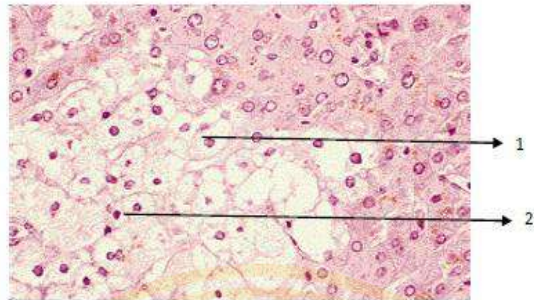
Aliran darah di hati dibagi dalam unit struktural yang disebut asinus hepatik. Asinus hepatik berbentuk seperti buah *berry*, terletak di traktus portal. Asinus ini terletak di antara 2 atau lebih vena hepatic terminal, dimana darah mengalir dari traktus portalis ke sinusoid, lalu ke vena tersebut. Asinus ini terbagi menjadi 3 zona, dengan zona 1 terletak paling dekat dengan traktus portal sehingga paling banyak menerima darah kaya oksigen, sedangkan zona 3 terletak paling jauh dan hanya menerima sedikit oksigen. Zona 2 atau zona intermediet berada diantara zona 1 dan 3. Zona 3 ini paling mudah terkena jejas iskemik (Junqueira *et al.*, 2007).



Gambar 2.3 Struktur histologis hati tikus normal pada perbesaran 1000x (Mulyono *et al.*, 2009)

2.3.4. Histopatologi Hati

Kerusakan pada hati terjadi oleh beberapa faktor yaitu onset pemaparan yang terlalu lama atau terlalu singkat, durasi pemaparan, dosis dan sel inang yang rentan (Jubb, 1993). Kerusakan yang terjadi pada sel hati dapat bersifat sementara dan tetap. Sel akan mengalami perubahan untuk beradaptasi mempertahankan hidup pada kerusakan yang bersifat sementara. Perubahan ini biasa disebut degenerasi. Degenerasi terjadi karena adanya gangguan biokimiawi yang disebabkan oleh iskemi, anemia, metabolisme abnormal dan zat kimia yang bersifat toksik. Hal ini menyebabkan membran sel normal akan mengalami kerusakan sehingga keseimbangan pengeluaran K^+ dan pemasukan ion Na^+ , Ca^+ dan air akan terganggu. Kerusakan membran sel akan menyebabkan peningkatan jumlah air ke dalam sel, sehingga menyebabkan sitoplasma menjadi bengkak dan dipenuhi butiran-butiran air. Apabila kerusakan membran sel terus berlangsung, maka sitoplasma sel akan berisi cairan yang membentuk vakuola-vakuola, sehingga sitoplasma terlihat lebih pucat, keadaan ini dinamakan degenerasi hidropis (Cheville, 1999).

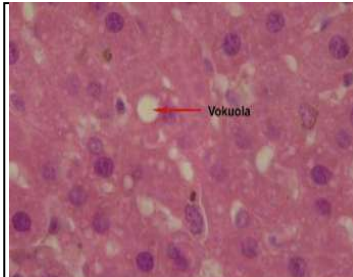


Gambar 2.4 pembengkakan sel disertai vakuolisasi.

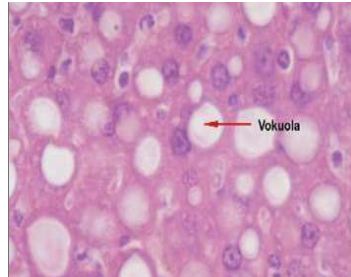
- 1. Vakuolisasi sel; 2. Inti sel menggeser ke tepi (Robbins *et al.*, 2007)**

Degenerasi bengkak keruh atau dapat juga disebut *cloudy swelling* merupakan degenerasi yang paling ringan dan merupakan degenerasi yang terdeteksi paling dini dari suatu keadaan patologik. Apabila diamati dibawah mikroskop, maka akan terlihat perubahan-

Perubahan berupa pembengkakan mitokondria, sitoplasma tampak keruh karena kadar protein atau asam amino bertambah, inhibisi sel oleh protein serum dan hidrasi ion natrium akibat permeabilitas dinding sel hati yang terganggu. Sitoplasma akan tampak sedikit bervakuola dan gelap daripada biasanya akibat kadar glikogen yang berkurang (Himawan, 1994).



Gambar 2.5 histopatologi hati tikus yang mengalami degenerasi melembak pada sebagian sel (Mulyono *et al.*, 2009)



Gambar 2.6 histopatologi hati tikus yang mengalami degenerasi melembak pada seluruh bagian sel (Mulyono *et al.*, 2009)

Kerusakan sel secara terus menerus akan mencapai suatu titik sehingga terjadi kematian sel. Mekanisme kematian sel terjadi melalui dua proses yaitu apoptosis dan nekrosis (Lu, 1995). Nekrosis adalah kematian sel yang merupakan kelanjutan dari degenerasi sel yang sifatnya irreversible tergantung pada lama dan jenis nekrosis. Tahap-tahap nekrosis meliputi piknosis, karioeksis, dan kariolisis. Piknosis ditandai dengan terjadinya penggumpalan kromatin dan tidak dikenali lagi anak inti (nukleus). Inti tampak lebih padat dan berwarna gelap hitam. Karioeksis ditandai dengan terjadinya kerusakan pada inti yaitu inti pecah berkeping-keping sehingga bentuknya menjadi tidak teratur. Kariolisis ditandai dengan inti yang mulai hilang hingga sulit dikenali secara mikroskopik, bentuk sel lebih memanjang dan warnanya menjadi tidak jelas setelah dilakukan pewarnaan (Himawan, 1994).

2.4. Tinjauan Tentang Ginjal

2.4.1. Anatomi ginjal

Ginjal kanan pada tikus terletak lebih kranial dibandingkan dengan ginjal kiri. Perbedaan yang sama juga terlihat pada susunan percabangan pembuluh darah renal, yaitu hubungan pembuluh darah ini ke aorta dan vena cava kaudal. Meskipun tidak mungkin dalam palpasi ginjal pada hewan muda, hal itu juga sulit dilakukan pada hewan dewasa (Suckow *et al.*, 2006)

Jika ginjal dibagi dua dari atas ke bawah, dua daerah utama yang dapat digambarkan yaitu korteks di bagian luar dan medula di bagian dalam. Medula ginjal terbagi menjadi beberapa massa jaringan berbentuk kerucut yang di sebut piramida ginjal (Guyton dan Hall, 2008). Piramida ginjal pada tikus berkembang secara sempurna, masuk pada daerah yang memiliki aliran darah yang kuat dan elemen tubulus (Suckow *et al.*, 2006)

Pada tikus dewasa, dengan berat badan antara 200-300 g, berat ginjal kiri adalah antara 0.7-2.0 g dengan panjang ginjal adalah sekitar 15 mm, lebarnya kurang lebih 9 mm, dan tebalnya sekitar 6 mm. Ketebalan korteks ginjal tikus adalah 4.0 mm, daerah luar medula 2.2 mm dan daerah dalam medula lebih tebal yaitu 6.0 mm. Data tersebut adalah hanya perkiraan dan dapat berbeda signifikan akibat perbedaan *strain*, usia, jenis kelamin dan pola makan pada tikus (Suckow *et al.*, 2006)

Masing-masing ginjal tikus terdiri dari kurang lebih 846 nefron dan masing-masing mampu membentuk urin (Suckow *et*

al., 2006). ginjal tidak dapat membentuk nefron baru. Oleh karena itu pada trauma ginjal, penyakit ginjal, atau proses penuaan yang normal akan terjadi penurunan jumlah nefron secara bertahap. Setiap nefron terdiri dari: 1) glomerulus yang dilalui sejumlah besar cairan yang terfiltrasi dari darah dan 2) tubulus yang panjang tempat cairan hasil filtrasi diubah menjadi urin dalam perjalanannya menuju pelvis ginjal (Guyton dan Hall, 2008).

Ginjal mendapatkan aliran darah dari arteri renalis yang merupakan cabang langsung dari aorta abdominalis, sedangkan darah vena dialirkan melalui vena renalis yang bermuara ke dalam vena kava inferior. Sistem arteri ginjal adalah *end arteries* yaitu arteri yang tidak mempunyai anastomosis dengan cabang-cabang dari arteri lain, sehingga jika terdapat kerusakan salah satu cabangarteri ini, berakibat timbulnya iskemia/nekrosis pada daerah yang dilayaninya (Purnomo, 2012).

2.4.2. Fisiologi Ginjal

Menurut Guyton dan Hall (2008), ginjal adalah organ utama untuk membuang produk sisa metabolisme yang tidak diperlukan lagi oleh tubuh. Produk-produk ini meliputi urea (dari sisa metabolisme asam amino), kreatin asam urat (dari asam nukleat), dan produk akhir dari pemecahan hemoglobin (bilirubin). Ginjal tersusun dari beberapa juta unit fungsional (nefron) yang akan melakukan ultrafiltrasi terkait dengan ekskresi (pembentukan urin) dan reabsorpsi. Kerja ginjal

dimulai saat dinding kapiler glomerulus melakukan ultrafiltrasi untuk memisahkan plasma darah dari sebagian besar air, ion-ion dan molekul-molekul.

Berikut ini adalah fungsi spesifik yang dilakukan oleh ginjal, yang sebagian besar ditunjukkan untuk mempertahankan kestabilan lingkungan cairan internal. Fungsi Eksresi: 1. Mempertahankan osmolalitas plasma sekitar 285 mili Osmol dengan mengubah ekresi air; 2. Mempertahankan volume ECF dan tekanan darah dengan mengubah ekskresi natrium; 3. Mempertahankan konsentrasi plasma masing-masing elektrolit individu dalam rentang normal; 4. Mempertahankan derajat keasaman/pH plasma sekitar 7,4 dengan mengeluarkan kelebihan hidrogen dan membentuk kembali karbonat; 5. Mengekskresikan produk akhir nitrogen dari metabolisme protein (terutama urea, asam urat dan kreatinin); 6. Bekerja sebagai jalur ekskretori untuk sebagian besar obat (Guyton dan Hall, 2008).

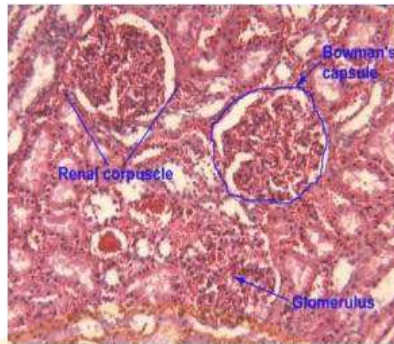
Sedangkan untuk fungsi non eksresi diantaranya Mensintesis dan mengaktifkan hormon: 1. Renin: penting dalam pengaturan tekanan darah. 2. Eritropoitin: merangsang produksi sel darah merah oleh sumsum tulang. 3. 1,25-dihidroksivitamin D3 sebagai hidroksilasi akhir vitamin D3 menjadi bentuk yang paling kuat. 4. Prostaglandin: sebagian besar adalah vasodilator bekerja secara lokal dan melindungi dari kerusakan iskemik ginjal. 5. Degradasi hormon polipeptida, insulin, glukagon, parathormon, prolaktin, hormon

pertumbuhan, ADH, dan hormon gastrointestinal (Guyton dan Hall, 2008).

2.4.3. Histologi Ginjal

Setiap ginjal dilapisi oleh kapsul jaringan ikat padat tidak teratur. Irisan sagital ginjal menunjukkan korteks yang lebih gelap di bagian luar dan medula yang lebih terang di bagian dalam, yang terdiri atas banyak piramida renalis bentuk kerucut. Basis setiap piramid renalis dan membentuk batas kortikomedularis. Apiks setiap piramid yang bulat meluas ke arah pelvis renalis untuk membentuk papila renalis. Sebagian korteks juga meluas ke masing-masing sisi piramid ginjal untuk membentuk columna renalis (Eroschenko, 2006).

korteks ginjal didominasi oleh corpusculum renalis dan tubulus ginjal. corpusculum renalis terdiri atas kapsula bowmann yang mengelilingi glomerulus. Tubulus-tubulus ginjal yang berada di korteks ginjal antara lain tubulus kontortus proksimal dan tubulus kontortus distal. Sedangkan tubulus kolektivus dan lengkung henle mendominasi bagian medula yang terpuas lebih pucat dibandingkan dengan korteks pada pengamatan di bawah mikroskop (Eroschenko, 2006).



Gambar 2.7 gambaran histologi Kortex ginjal (Eroschenko, 2006)

2.4.4. Histopatologi Ginjal

Struktur histologi dari tubulus proksimal adalah epitel kolumnar atau piramid dimana bagian basis lebih lebar daripada apeksnya, batas sel tidak jelas, permukaan sel terdapat *brush border*, inti bulat dan besar, terletak agak ke arah basis (McFarland, 2000).

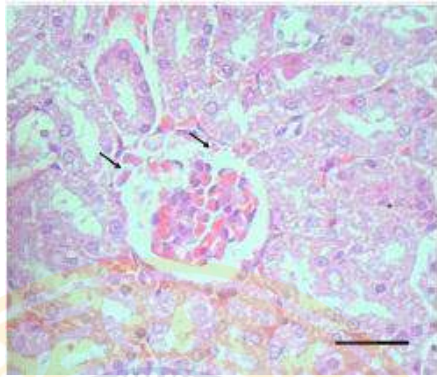
Pada umumnya dengan paparan rendah terjadi perubahan fisiologis dari tubulus proksimal, namun pada paparan dosis tinggi perubahan morfologi juga dapat terjadi. Terdapat dua perubahan morfologi yang sering terjadi pada ginjal adalah perubahan morfologi yang reversibel dan irreversibel. Perubahan reversibel antara lain adalah degenerasi sel tubulus dan terbentuknya *cast*, sedangkan bentuk irreversibel dari sel tubulus antara lain adalah atrofi atau dilatasi lumen, fibrosis sel tubulus, dan yang paling berat adalah nekrosis sel tubulus. Perubahan irreversibel biasanya

ditandai dengan hilangnya *brush border* dan inti sel memipih (McFarland, 2000).

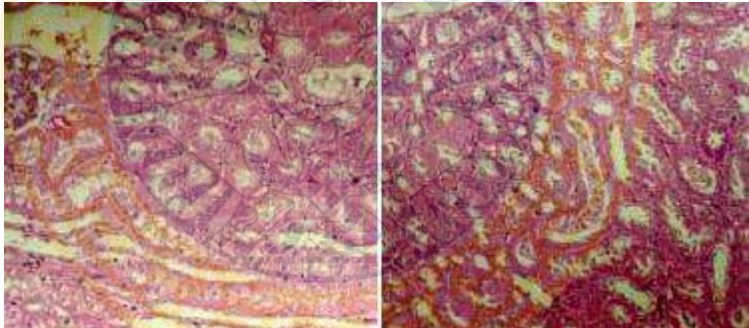
Penyebab cedera tubulus proksimal atau yang sering disebut *Acute Tubular Necrosis* (ATN) adalah keadaan syok dan akibat terdapat zat toksik. Untuk keadaan akibat syok, kerusakan tubulus sebagai akibat dari iskemia dan sering menyebabkan kerusakan tubulus distal. Sedangkan akibat paparan zat toksik kerusakan lebih kepada tubulus proksimal (McFarland, 2000).

Tubulus proksimal memiliki fungsi utama yaitu menyerap kembali natrium, albumin, glukosa dan air, dan juga bermanfaat dalam penggunaan kembali bikarbonat. Epitelium tubulus proksimalis merupakan bagian yang paling sering terserang iskemia atau rusak akibat toksin, karena kerusakan yang terjadi akibat laju metabolisme yang tinggi (Suyanti, 2008).

Nefrosis merupakan istilah morfologik untuk kelainan ginjal degeneratif terutama yang mengenai tubulus. Kelainan tubulus dapat menyebabkan albuminuria dan sedimen abnormal di urin. Secara mikroskopis kelainan dijumpai pada tubulus kontortus proksimal berupa degenerasi hidropis, degenerasi lemak, nekrosis dan kalsifikasi (Suyanti, 2008).



Gambar 2.8 Edema glomerulus pada ginjal tikus yang dikelilingi oleh tubulus yang mengalami degenerasi hidropis (Suyanti, 2008).



Gambar 2.9 Potongan melintang ginjal tikus yang mengalami kerusakan (Soeksmanto, 2006).

2.6 Tinjauan tentang Hewan Coba Tikus (*Rattus Norvegicus*)

Berikut adalah taksonomi dari tikus (sharp dan Regina, 2010):

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia
Famili : Muridae
Genus : Rattus
Species : *Rattus norvegicus*



Gambar 2.10 *Rattus norvegicus*

Tikus adalah binatang nokturnal dengan sebagian besar aktivitas terjadi di malam hari dan dini hari. Meskipun ada perbedaan strain, tikus biasanya tidak agresif dan mudah dilatih. Penanganan sering mendorong sifat non-agresif mereka karena mereka beradaptasi dengan lingkungan baru atau situasi dalam penelitian. Penanganan yang tidak tepat, ataupun kekurangan makanan dapat mengakibatkan perilaku yang tidak diinginkan. Tikus jantan biasanya lebih agresif daripada tikus betina. Tikus merasa paling nyaman di ruangan/ tempat yang gelap, ruang terbatas dan kecil. Ketika merancang eksperimen, penting untuk memahami perilaku koprofagia tikus dan dampak potensial terhadap metabolisme, obat, maupun penelitian lain (sharp dan Regina, 2010).

Kemampuan untuk tumbuh, berbiak, hidup lama atau reaksi setelah pengobatan dipengaruhi oleh salah satu faktor penting yaitu kualitas makanan. Bahan dasar makanan tikus dapat juga sedikit bervariasi, misalnya: protein 20-25%, lemak 5%, pati 45-50%, serat kasar kira 5% dan abu 4-5%. Makanan tikus harus mengandung vitamin A (4000 IU/kg), vitamin D (1000 IU/kg), alfa-tokoferol (30 mg/kg), asam linolenat (3g/kg), dan lain-lain. Keperluan mineral dalam makanan tikus yaitu kalsium, fosfor, magnesium, kalium, natrium, tembaga, yodium, besi, mangan dan seng (Kusumawati, 2004)

Pemberian bahan uji pada hewan coba harus diupayakan sebaik mungkin agar tidak menimbulkan stres atau nyeri pada hewan. Adapun cara-cara pemberian bahan uji diantaranya: intraperitoneal, subkutan dan intramuskular, intradermal, peroral dan intravena (Kusumawati, 2004).

BAB III

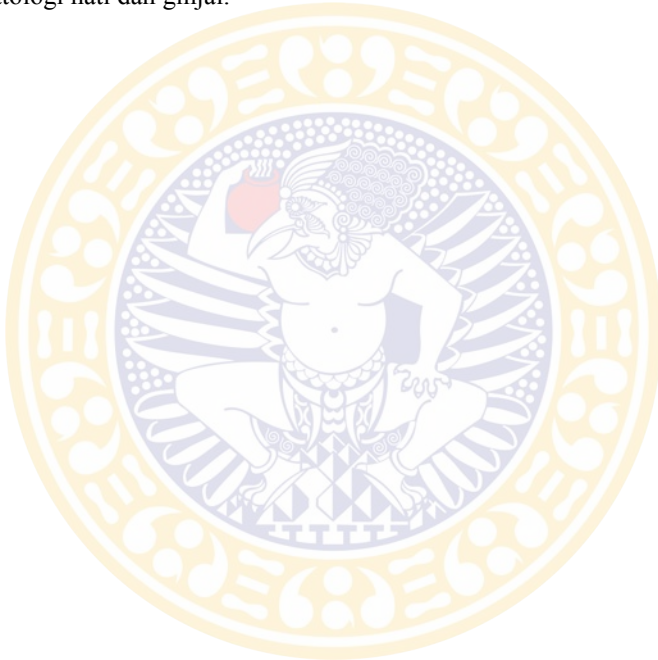
KERANGKA KONSEPTUAL

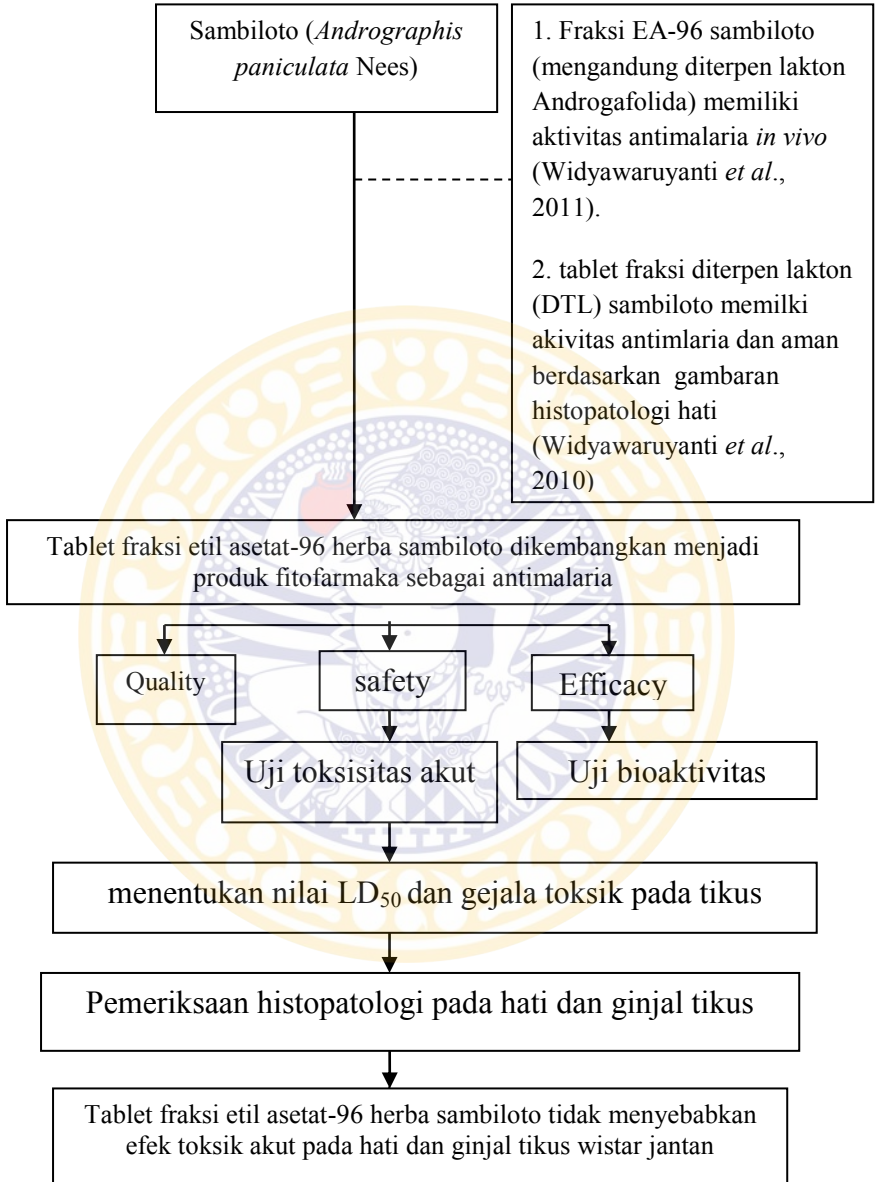
Andrographis paniculata Nees atau oleh masyarakat Indonesia dikenal dengan nama sambiloto merupakan tanaman obat yang penting dan telah digunakan secara luas di seluruh dunia. Secara turun temurun tanaman ini telah digunakan untuk penyembuhan gigitan ular, gigitan serangga, diabetes, disentri, demam dan malaria (Hossain, 2014). Sedangkan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rahman dan Mishra menunjukkan bahwa ekstrak *A. Paniculata* memiliki aktivitas sebagai antimalaria melalui uji secara *in vitro* maupun *in vivo* (Rahman, 1999; Mishra et al., 2009).

Sebagai upaya meningkatkan khasiat dan keberhasilan terapi malaria, telah dilakukan pengembangan fraksi etil asetat (EA)-96 herba sambiloto yang mengandung senyawa diterpen lakton Andrografolida sebagai produk fitofarmaka. Fraksi etil asetat-96 tersebut menunjukkan aktivitas antimalaria *in vivo* pada mencit terinfeksi malaria (Widyawaruyanti *et al.*, 2011). Kemudian dilakukan studi formulasi dan produksi tablet dari fraksi etil asetat-96. Pada penelitian sebelumnya, uji toksisitas akut dan subakut yang dilakukan pada tablet fraksi diterpen lakton (DTL) diperoleh bahwa pemberian tablet DTL tidak berpengaruh pada kadar SGOT dan SGPT pada hewan coba serta memberikan gambaran histopatologi hepar yang normal (Widyawaruyanti *et al.*, 2010). Namun uji toksisitas ini belum dilakukan pada tablet fraksi EA-96 herba sambiloto sebagai produk fitofarmaka.

Fitofarmaka adalah obat tradisional yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya, dan bahan bakunya terdiri atas simplisia atau

sediaan galenic yang telah memiliki persyaratan yang berlaku (Depkes RI, 1993). Untuk membuktikan kemanannya dapat dilakukan uji toksisitas. Uji toksisitas meliputi uji toksisitas akut oral, toksisitas subkronis oral, toksisitas kronisoral, dan lain-lain (BPOM, 2014). Pada penelitian ini akan dilakukan uji toksisitas akut pada tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto pada hewan coba yaitu tikus wistar jantan dengan parameter LD₅₀, histopatologi hati dan ginjal.





Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan Penelitian

4.1.1. Bahan Uji

Bahan yang diuji adalah tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) berwarna hijau tua, rasa pahit dengan bobot tablet $650 \pm 5\%$ mg, mengandung 167.5 mg fraksi etil asetat-96 (setara dengan 35 mg Androgafolida) per tablet. Simplisia diperoleh dari Divisi Risbang PT. Kimia Farma Tbk., dengan kadar Androgafolida 1.825%. Tablet diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga (Widyawaruyanti *et al.*, 2015).

4.1.2. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah : aquadest, suspensi CMC Na 0.5%, formalin 10%, Hematoxilin Eosin, Xylol, dan Paraffin cair.

4.1.3. Hewan Percobaan

Dalam penelitian ini digunakan rodensia tikus putih strain *Wistar* jenis kelamin jantan dewasa dan sehat berumur 8-12 minggu (2-3 bulan). Hewan percobaan diperoleh dari laboratorium parasitologi Universitas Brawijaya Malang dengan berat badan antara 120-200 g.

4.2. Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas yang umum di laboratorium, sonde, timbangan mencit, timbangan analitik, alat bedah, alat-alat untuk histopatologi serta

seperangkat alat uji toksisitas yang lazim digunakan untuk uji toksisitas akut.

4.3. Metode Penelitian

4.3.1. Rancangan Penelitian

Uji toksisitas akut oral yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode *fixed doses*. Sekelompok hewan uji dengan jenis kelamin yang sama diberikan dosis bertingkat antara lain: 5, 50, 300 dan 2000 mg/kg.

Disiapkan 5 kelompok tikus dan masing-masing kelompok menerima dosis yang berbeda. Tiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus jantan. Untuk semua kelompok, kecuali kelompok kontrol negatif, tiap hewan coba diberi suspensi tablet sambiloto sesuai dosis masing-masing. Pemberian dilakukan secara per oral sebanyak satu kali kemudian dilakukan pengamatan selama 14 hari.

Kelompok kontrol negatif : diberi suspensi CMC Na 0,5 %,
Kelompok 1 : diberi suspensi tablet fraksi EA-96 sambiloto dosis 5 mg/ kg BB
Kelompok 2 : diberi suspensi tablet fraksi EA-96 sambiloto dosis 50 mg/ kg BB,
Kelompok 3 : diberi suspensi tablet fraksi EA-96 sambiloto dosis 300 mg/ kg BB,

Kelompok 4 : diberi suspensi tablet fraksi EA-96 sambiloto dosis 2000 mg/ kg BB.

4.3.2. Penyiapan Hewan Uji

Tikus yang akan digunakan diaklimatisasi selama satu minggu. Semua tikus dipelihara dengan cara yang sama dan diberi diet yang sama pula. Hewan uji diberi pakan yang diberikan tanpa batas (*ad libitum*). Suhu ruangan untuk pemeliharaan hewan uji adalah $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ dan penerangan 12 jam terang 12 jam gelap. Sebelum perlakuan, tikus ditimbang untuk mengetahui berat badan sehingga mempermudah dalam pengaturan dosis. Tikus dipuaskan terlebih dahulu selama 14 jam sebelum diberi bahan uji.

4.3.3. Penentuan Dosis

Dosis efektif tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto sebagai antimalaria untuk manusia adalah 140 mg Androgafolida sedangkan jika dikonversi ke tikus dengan faktor konversi 0.018 adalah 2.52 mg Androgafolida. Sehingga dosis untuk uji toksisitasnya adalah menurut ketentuan dari BPOM yaitu sekelompok hewan uji dengan jenis kelamin yang sama diberikan dosis bertingkat menggunakan metode *fixed doses* antara lain: 1) 5 mg/kg BB (mengandung 1.29 mg fraksi atau setara dengan 0.27 mg Androgafolida); 2) 50 mg/kg BB (mengandung 12.90 mg fraksi atau setara dengan 2.70 mg Androgafolida); 300 mg/kg BB (mengandung 77.31 mg fraksi atau setara dengan 16.15 mg

Androgafolida); dan 2000 mg/kg BB (mengandung 515.38 mg fraksi atau setara dengan 107.69 mg androgafolida).

4.3.4. Penyiapan Bahan Uji

1. Pembuatan mucilago CMC Na 0,5 %:

Ditimbang 0,5 g CMC Na, ditaburkan di atas air panas secukupnya, dibiarkan mengembang \pm 15 menit, digerus dengan mortir dan stamper sampai homogen. Kemudian dipindahkan ke dalam botol yang telah dikalibrasi dan ditambah aquadest sampai 100 ml. Mucilago CMC Na ini diberikan pada kelompok kontrol negatif sebanyak 2 ml/200 g BB tikus secara oral.

2. Pembuatan suspensi tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto

a. Untuk kelompok 1 (dosis 5 mg/kg BB)

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 5 \text{ mg} = 1 \text{ mg} / 200 \text{ g BB tikus}$$

$$\text{Untuk 5 tikus} = 1 \text{ mg} \times 5 = 5 \text{ mg}$$

(5 mg tablet mengandung 1.29 mg fraksi atau setara dengan 0.27 mg Androgafolida)

Sebanyak 5 mg tablet ditimbang kemudian disuspensikan dengan 10 ml CMC Na 0.5%

b. Untuk kelompok 2 (dosis 50 mg/kg BB)

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 50 \text{ mg} = 10 \text{ mg} / 200 \text{ g BB tikus}$$

$$\text{Untuk 5 tikus} = 10 \text{ mg} \times 5 = 50 \text{ mg}$$

(50 mg tablet mengandung 12.90 mg fraksi atau setara dengan 2.70 mg Androgafolida).

Sebanyak 50 mg tablet ditimbang kemudian disuspensikan dengan 10 ml CMC Na 0.5%.

- c. Untuk kelompok 3 (dosis 300 mg/Kg BB)

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 300 \text{ mg} = 60 \text{ mg}/200\text{g BB tikus}$$

$$\text{Untuk 5 tikus} = 60 \text{ mg} \times 5 = 300 \text{ mg}$$

(300 mg tablet mengandung 77.31 mg fraksi atau setara dengan 16.15 mg Androgafolida).

Sebanyak 300 mg tablet ditimbang kemudian disuspensikan dengan 10 ml CMC Na 0.5%.

- d. Untuk kelompok 4 (dosis 2000 mg/kgBB)

$$\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 2000 \text{ mg} = 400 \text{ mg}/200\text{g BB tikus}$$

$$\text{Untuk 5 tikus} = 400 \text{ mg} \times 5 = 2000 \text{ mg}$$

(2000 mg tablet mengandung 515.38 mg fraksi atau setara dengan 107.69 mg Androgafolida).

Sebanyak 2000 mg tablet ditimbang kemudian disuspensikan dengan 10 ml CMC Na 0.5%.

4.3.5. Pengumpulan Data

Disiapkan 5 kelompok tikus yang masing-masing menerima dosis yang berbeda tiap kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus jantan. Untuk semua kelompok kecuali kelompok kontrol negatif, diberi suspensi tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto sesuai dosis.

Hewan uji diobservasi secara individual sekurang-kurangnya pada 30 menit pertama setelah pemberian sediaan uji, dan setelah 4 jam pertama setelah pemberian sediaan uji. Kemudian diamati sehari sekali setelah itu selama 14 hari. Hal-hal yang harus diamati dalam periode observasi adalah:

a. Gejala toksisitas yang muncul, diantaranya: hipersekresi hidung, salivasi, diare, gelisah, posisi duduk kepala diatas, sering menjilat-jilat tubuh, terengah-engah, peka terhadap nyeri dan sentuhan, tremor, lemas, ekor melengkung keatas membentuk huruf S, midriasis, miosis, menggigil, edema, bengkak.

b. Berat Badan

Berat badan masing-masing hewan harus dimonitor pada saat sebelum diberikan sediaan uji dan setelah pemberian sediaan uji tiap tiga hari sekali. Pada akhir penelitian, hewan yang masih bertahan hidup ditimbang dan kemudian dikorbankan.

a. kematian hewan uji

b. Pengamatan makroskopik organ hati dan ginjal, meliputi berat relatif organ

d. Pemeriksaan Histopatologi

pemeriksaan histopatologi dilakukan pada seluruh hewan yang mati maupun yang masih hidup sampai akhir percobaan. Dilakukan pengamatan terhadap preparat histopatologi organ hati dan ginjal menggunakan mikroskop cahaya.

4.3.6. Analisis Data

a. Penentuan LD₅₀

Data yang diperoleh dalam penelitian ini diolah dengan menggunakan analisis probit, suatu program komputer yang dibuat untuk menentukan LD₅₀ dari suspensi tablet sambiloto yang diuji. Prinsip pengolahan data dari program ini adalah mengekstrapolasikan dosis bahan uji dengan jumlah letalitas (kematian) tikus yang diuji.

b. Pemeriksaan Histopatologi Hati dan Ginjal

Histopatologi organ diamati menggunakan mikroskop cahaya. Mula-mula digunakan perbesaran 100 kali kemudian 400 kali. Setiap preparat hati dan ginjal diamati melalui lima pandang yang berbeda.

Pada setiap lapang pandang diamati perubahan-perubahan yang terjadi. Setiap preparat digeser minimal lima kali lapang pandang kemudian skor dijumlah dan dibagi lima, maka hasil dari lima kali pergeseran itu adalah data dari satu preparat. Cara pemberian skor adalah sebagai berikut: apabila tidak terjadi perubahan histopatologi organ hati dan ginjal, maka diberi skor 0 (nol), jika terjadi perubahan histopatologi kurang dari 30% lapang pandang, maka akan diberi skor 1 (satu) dan dianggap perubahan tingkat ringan. Apabila perubahan yang terjadi adalah 30-50%, dianggap perubahan histopatologi tingkat sedang dan diberi skor 2 (dua). Dikatakan mengalami perubahan histopatologi tingkat berat apabila pada satu lapang pandang terjadi perubahan histopatologi lebih dari 50% dan diberi skor 3 (tiga) (Arsad *et al.*, 2014).

Tabel IV.1 Perubahan Parameter Histopatologi Organ

Organ	Perubahan Histopatologi
Hati	Kongesti
	dilatasi sinusoid
	vakuolisasi sitoplasma
Ginjal	Nekrosis
	<i>granular cast</i>
	<i>cellular cast</i>
	Degenerasi hidropis
	Nekrosis

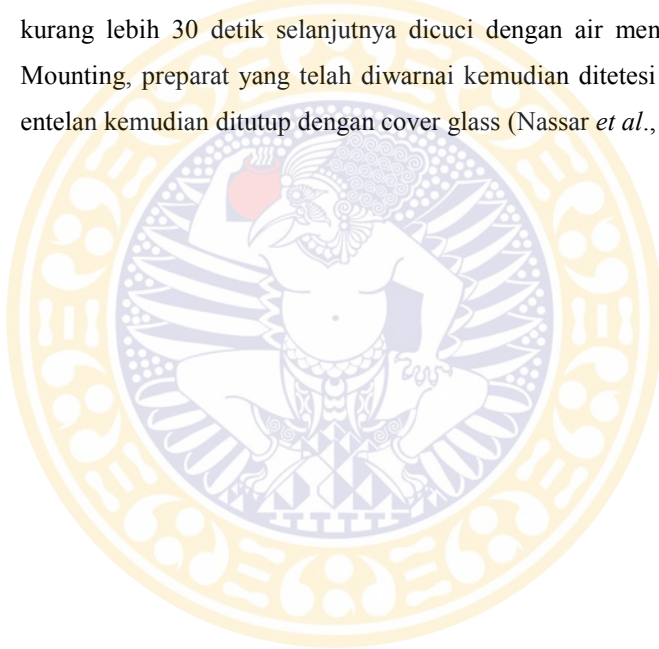
Data perubahan gambaran histopatologi hati dan ginjal tikus yang telah diberi skor diolah dengan penilaian peringkat (*rank*) lalu dianalisis menggunakan uji statistik non parametrik dengan uji Kruskal-Wallis. Bila terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Perbandingan Berganda (Uji Z) 5%.

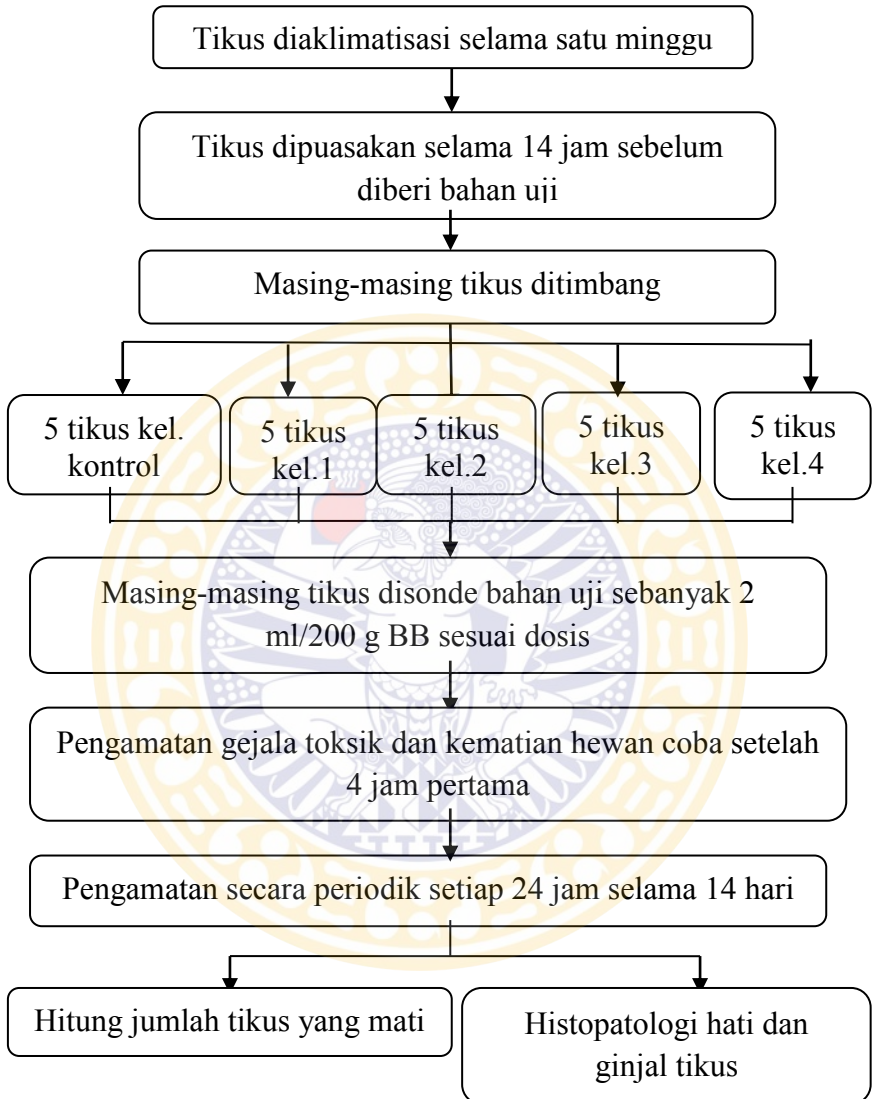
4.3.7. Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dilaksanakan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Cara pembuatannya melalui beberapa tahap, yaitu: 1. fiksasi, yaitu merendam organ dalam formalin 10% minimal 1x24 jam dengan volume larutan 5 kali besar spesimen, dilanjutkan pencucian dengan air; 2. Dehidrasi, organ yang telah difiksasi kemudian dipotong kira-kira 1 cm dan direndam alkohol secara bertingkat (alkohol 70%, 80%, 90%, 95% dan 100%) masing-masing satu hari yang bertujuan untuk menarik air dari dalam jaringan; 3. *Clearing*, organ dibersihkan dengan direndam alkohol dan xilol (3;1, 1:1, 1:3) masing-masing selama 30 menit kemudian direndam dalam xilol satu hari; 4. infiltrasi, organ dimasukkan dalam xilol: paraffin (1:1) selama 30 menit, dan kemudian dimasukkan dalam paraffin ; 5. *embedding*, yaitu organ dimasukkan ke dalam cetakan yang sebelumnya telah diolesi dengan gliserol dan diisi dengan paraffin cair pada dasarnya, organ yang akan diamati diletakkan melintang kemudian paraffin cair dituang sampai cetakan penuh. Selanjutnya didiamkan pada suhu ruang selama sehari, sampai paraffin benar-benar mengeras,

setelah itu didinginkan ke dalam lemari pendingin pada suhu 4°C;

6. Pemotongan (sectioning) hasil cetakan dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mikrometer;
7. Afiksing, irisan yang diperoleh dari pemotongan tersebut diletakkan diatas gelas objek yang telah ditetesi air kemudian dilakukan rehidrasi dengan direndam alkohol bertingakat selama kurang lebih 30 detik kemudian direndam dalam pewarna hematoxilin eosin selama kurang lebih 30 detik selanjutnya dicuci dengan air mengalir
8. Mounting, preparat yang telah diwarnai kemudian ditetesi dengan entelan kemudian ditutup dengan cover glass (Nassar *et al.*, 2008).





Gambar 4.1 Skema Kerja

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1. Perhitungan Dosis Fraksi

Dosis efektif tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto sebagai antimalaria untuk manusia adalah 140 mg androgafolida (Widyawaruyanti *et al.*, 2015), sedangkan jika dikonversi ke tikus dengan faktor konversi 0.018 adalah 2.52 mg androgafolida (12,60 mg/kg BB). Sehingga dosis untuk uji toksisitasnya adalah menurut ketentuan dari BPOM yaitu sekelompok hewan uji dengan jenis kelamin yang sama diberikan dosis bertingkat menggunakan metode *fixed doses*. Kemudian dari tiap tablet yang ditimbang dihitung berapa kandungan fraksi dan androgafolida. Hasil perhitungan ditunjukkan pada tabel V.1

Tabel V.1 Kandungan fraksi dan androgafolida tiap dosis

Dosis Tablet (mg/kg BB)	Fraksi (mg/kg BB)	Androgafolida (mg/kg BB)
5	1,29	0,27
50	12,88	2,69
300	77,31	16,15
2000	515,38	107,69

5.2. Hasil Pengamatan Kematian Hewan Coba dan Nilai LD₅₀

Hasil pengamatan terhadap kematian hewan coba setelah 4 jam pertama, 24 jam pertama dan selama 14 hari ditunjukkan pada tabel V.2.

Tabel V.2 Hasil pengamatan kematian hewan uji

Kelompok	Dosis Tablet (mg/kg BB)	Jumlah tikus	
		Hidup	Mati
Kontrol negatif	CMC Na 0,5%	5	0
K 1	5	5	0
K 2	50	5	0
K 3	300	5	0
K 4	2000	5	0

Karena tidak ditemukan satupun hewan coba yang mati hingga dosis tertinggi 2000 mg/kg BB, maka nilai LD₅₀ dari tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto adalah lebih dari 2000 mg/kg BB. Sedangkan menurut OECD (2008) bahan uji yang memiliki LD₅₀ lebih dari 2000 mg/kg BB adalah tergolong bahan yang aman.

5.3. Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas Pada Tikus

Setelah diberi sediaan uji, dilakukan pengamatan terhadap tanda-tanda toksisitas dan gejala-gejala yang terjadi pada hewan coba, gejala-gejala yang terjadi pada tikus selama uji toksisitas akut setelah 4 jam pertama, 24 jam pertama dan selama 14 hari berturut-turut ditunjukkan pada tabel V.3, V.4, dan V.5.

Tabel V.3 Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas pada Tikus setelah 4 jam Pertama

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	feses lembek
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Pengamatan tanda-tanda toksisitasnya, antara lain (Loomis, 1978): 1. Autonomik seperti hipersekresi hidung, salivasi, diare, keluar air seni; 2. Perilaku, seperti sedasi, gelisah, posisi duduk kepala diatas, sering menjilat-jilat tubuh, terengah-engah, sikap agresif atau defensif; 3. Sensorik, seperti peka terhadap nyeri, peka terhadap bunyi dan sentuhan; 4. Sensorik seperti tremor, lemas, ekor melengkung keatas membentuk huruf S; 5. Kardiovaskuler seperti denyut jantung meningkat atau berkurang; 6. Mata, seperti midriasis, miosis; 7. Kulit seperti menggigil, edema, bengkak.

Pada 4 jam pertama setelah pemberian bahan uji, tidak ditemukan adanya gejala toksisitas pada semua kelompok baik pada kelompok kontrol negatif maupun kelompok perlakuan. Namun, terdapat perbedaan struktur feses pada kelompok dosis 2000 mg/kg BB yaitu produksi feses yang lebih lembek dibandingkan dengan kelompok yang lain.

Tabel V.4 Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas pada Tikus setelah 24 jam pertama

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	feses lembek
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Begitu pula pada 4 jam setelah pemberian bahan uji, tidak ditemukan adanya gejala toksisitas pada semua kelompok baik pada kelompok kontrol negatif maupun kelompok perlakuan. Namun, masih terdapat perbedaan struktur feses pada kelompok dosis 2000 mg/kg BB yaitu produksi feses yang lebih lembek dibandingkan dengan kelompok yang lain.

Tabel V.5 Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas pada Tikus setelah 48 jam pertama

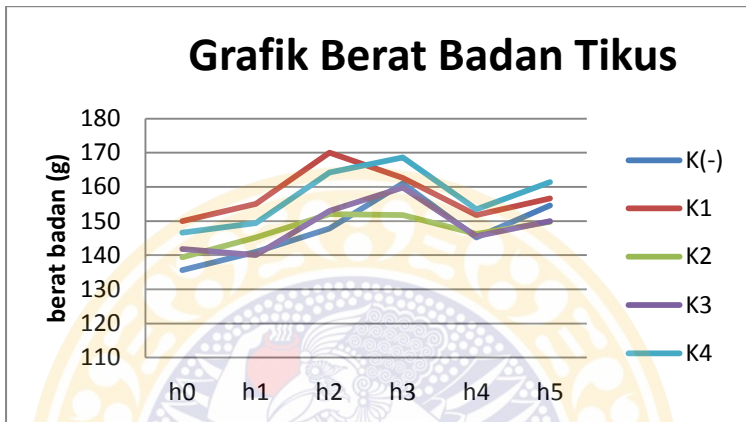
No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Kemudian pada pengamatan selanjutnya yaitu pada hari ketiga pengamatan (48 jam setelah pemberian bahan uji), produksi feses kelompok dosis 2000 mg/kg BB normal kembali atau sama dengan produksi feses kelompok yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa gangguan pencernaan yang terjadi pada tikus kelompok dosis 2000 mg/kg BB terjadi selama dua hari, dan pada hari ketiga sudah terlihat adanya *recovery*.

5.4. Hasil Pengamatan Berat Badan Tikus

Berat badan tiap tikus dimonitor pada saat sebelum diberikan sediaan uji dan setelah pemberian sediaan uji tiap tiga hari sekali

selama 14 hari. Berikut hasil pengamatan berat badan tikus ditunjukkan pada grafik 5.1.



Gambar 5.1. Grafik Berat Badan Tikus Tiap Kelompok; (h0) hari ke-1; (h1) hari ke-4; (h2) hari ke-7; (h3) hari ke-10; (h4) hari ke-13; (h5) hari ke-14

Pada pengamatan berat badan tikus pada h1 (hari ke-4 setelah pemberian bahan uji), rata-rata berat badan kelompok K(-), K1 dan K2 mengalami penambahan berat badan secara berturut-turut yaitu sebesar 5,4 gram, 5 gram dan 5,8 gram, sedangkan tikus K3 (dosis 300 mg/kg BB) mengalami penurunan berat badan sebesar 1,8 gram dan pada tikus K4 (dosis 2000 mg/kg BB) mengalami kenaikan rata-rata berat badan hanya 2,8 gram. Pada pengamatan h4 (hari ke-13), berat badan tikus pada semua kelompok mengalami penurunan, sedangkan pada hari terakhir pengamatan yaitu hari ke-14, berat badan pada semua kelompok mengalami peningkatan. Peningkatan berat badan yang terjadi seiring dengan bertambahnya umur hewan coba.

Tabel V.6. Hasil pengamatan perubahan berat badan tikus dari hari pertama sampai hari ke-14

Kelompok	Rerata ± SD
kontrol negatif	19,00 ± 12,57
K1 (dosis 5 mg/kgBB)	7,80 ± 6,41
K2 (dosis 50 mg/kgBB)	12,40 ± 11,10
K3 (dosis 300 mg/kgBB)	8,20 ± 5,54
K4 (dosis 2000 mg/kgBB)	16,00 ± 9,27

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna pada perubahan berat badan tikus pada semua kelompok selama 14 hari ($p > 0.05$). Berat badan tikus pada semua kelompok mengalami peningkatan berat badan dikarenakan seiring dengan bertambahnya umur hewan coba. Dan sebaliknya, tidak ada satupun tikus yang mengalami penurunan berat badan lebih dari 10%.

5.5. Hasil Pengamatan Berat Relatif Organ

Pengamatan makroskopik organ dilakukan dengan cara menghitung berat relatif organ dari dua organ vital, yaitu hati dan ginjal. Berat relatif organ diperoleh dari hasil perhitungan dibawah ini:

$$\text{Berat relatif organ} = \frac{\text{berat organ absolut (g)}}{\text{berat badan (g)}} \times 100\%$$

Hasil pengamatan berat relatif organ hati dan ginjal tikus ditunjukkan pada tabel V.6.

Tabel V.6. Hasil Pengamatan Berat Relatif Organ Hati dan Ginjal

Kelompok	Hati (%)	Ginjal (%)
	rerata \pm SD	rerata \pm SD
kontrol negatif	4,67 \pm 0,48	0,80 \pm 0,10
K1	4,04 \pm 0,49	0,76 \pm 0,04
K2	4,34 \pm 0,38	0,79 \pm 0,06
K3	4,12 \pm 0,21	0,74 \pm 0,01
K4	4,26 \pm 0,48	0,77 \pm 0,12

Dari hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna pada berat relatif organ hati dan ginjal pada semua kelompok ($p > 0.05$). sehingga diketahui bahwa pemberian tablet fraksi EA-96 herba sambiloto tidak menyebabkan perubahan berat organ hati dan ginjal tikus Wistar jantan pada uji toksisitas akut.

5.6. Hasil Pengamatan Histopatologi Hati

Dari hasil pengamatan histopatologi hati uji toksisitas akut, diketahui bahwa ada beberapa kerusakan yang terjadi pada hati tikus kelompok kontrol negatif maupun kelompok perlakuan, diantaranya: kongesti vena centralis, dilatasi sinusoid dan oedema. Kerusakan yang terjadi adalah kerusakan tingkat ringan hingga sedang (kurang dari 50% lapang pandang/ skor 0-2). Dan sebaliknya, pada semua kelompok tidak ditemukan adanya nekrosis (skor 0).

5.6.1. Pengamatan Kongesti pada Vena Centralis

Hasil pengamatan kongesti pada vena centralis hati tikus ditunjukkan pada tabel V.7 berikut ini.

Tabel V.7. Hasil Pengamatan Kongesti pada Vena Centralis

Kelompok	Mean Rank
kontrol negatif	17,20
K1	10,30
K2	10,30
K3	11,30
K4	15,90

Dari hasil analisis statistik non parametrik menggunakan uji Kruskal-Wallis, diketahui bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna pada semua kelompok ($p > 0.05$).

5.6.2. Pengamatan Dilatasi Sinusoid

Hasil pengamatan dilatasi sinusoid hati tikus pada semua kelompok perlakuan ditunjukkan pada tabel V.8 berikut ini.

Tabel V.8. Hasil Pengamatan Dilatasi Sinusoid

Kelompok	Mean Rank
kontrol negatif	12,50
K1	11,80
K2	12,50
K3	11,80
K4	16,40

Dari hasil analisis statistik non parametrik menggunakan uji Kruskal-Wallis, diketahui bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna pada semua kelompok ($p > 0.05$).

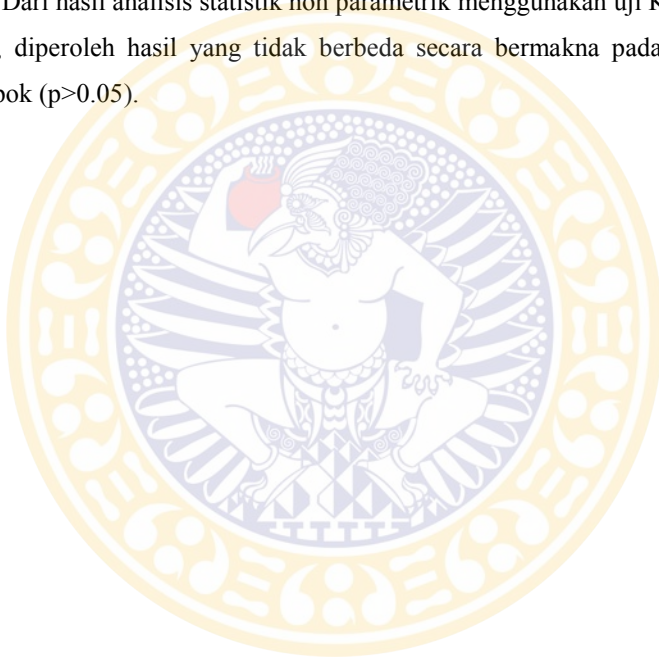
5.6.3. Pengamatan Sel Hati yang Mengalami Oedema

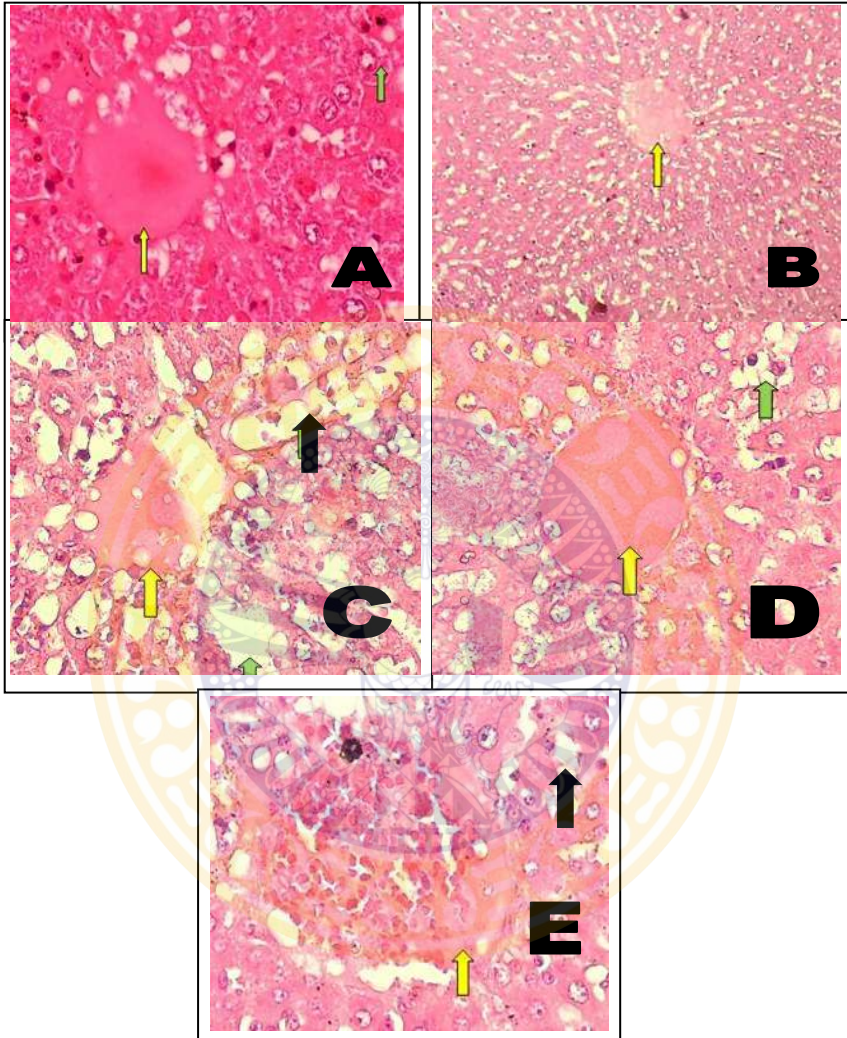
Hasil pengamatan sel hati tikus yang mengalami oedema pada semua kelompok ditunjukkan pada tabel V.9 berikut ini.

Tabel V.9. Hasil Pengamatan Sel yang Mengalami Oedema

Kelompok	Mean Rank
kontrol negatif	16,50
K1	11,50
K2	14,00
K3	11,50
K4	11,50

Dari hasil analisis statistik non parametrik menggunakan uji Kruskal-Wallis, diperoleh hasil yang tidak berbeda secara bermakna pada semua kelompok ($p > 0.05$).





Gambar 5.2 hasil pengamatan histopatologi hati pewarnaan HE perbesaran 400 kali (A) Kelompok kontrol negatif; (B) Kelompok 1; (C) Kelompok 2; (D) kelompok 3; (E) kelompok 4. (Panah kuning) kongesti; (panah hitam) dilatasi sinusoid; (panah hijau) oedema

5.7. Hasil Pengamatan Histopatologi Ginjal

Dari hasil pengamatan histopatologi ginjal uji toksisitas akut, diketahui bahwa ada beberapa kerusakan yang terjadi pada ginjal tikus kelompok kontrol negatif maupun kelompok perlakuan, diantaranya: *cellular cast*, *granular cast* dan degenerasi hidrofik. Kerusakan yang terjadi adalah kerusakan tingkat ringan (kurang dari 30% lapang pandang/ skor 0-1). Dan sebaliknya, pada semua kelompok tidak ditemukan adanya nekrosis (skor 0).

5.7.1. Pengamatan *Granular Cast*

Hasil pengamatan *granular cast* pada ginjal tikus ditunjukkan pada tabel V.10 berikut ini.

Tabel V.10. Hasil Pengamatan *Granular Cast*

Kelompok	Mean Rank
kontrol negatif	16,50
K1	14,00
K2	11,50
K3	11,50
K4	11,50

Dari hasil analisis statistik non parametrik menggunakan uji Kruskal-Wallis diperoleh bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna pada semua kelompok ($p > 0.05$).

5.7.2. Pengamatan *Cellular Cast*

Hasil pengamatan adanya *cellular cast* pada ginjal tikus ditunjukkan pada tabel V.11 berikut ini

Tabel V.11. Hasil Pengamatan *Cellular cast*

Kelompok	Mean Rank
kontrol negatif	15,00
K1	12,50
K2	12,50
K3	12,50
K4	12,50

Dari hasil analisis statistik non parametrik menggunakan uji Kruskal-Wallis diketahui bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok ($p > 0.05$).

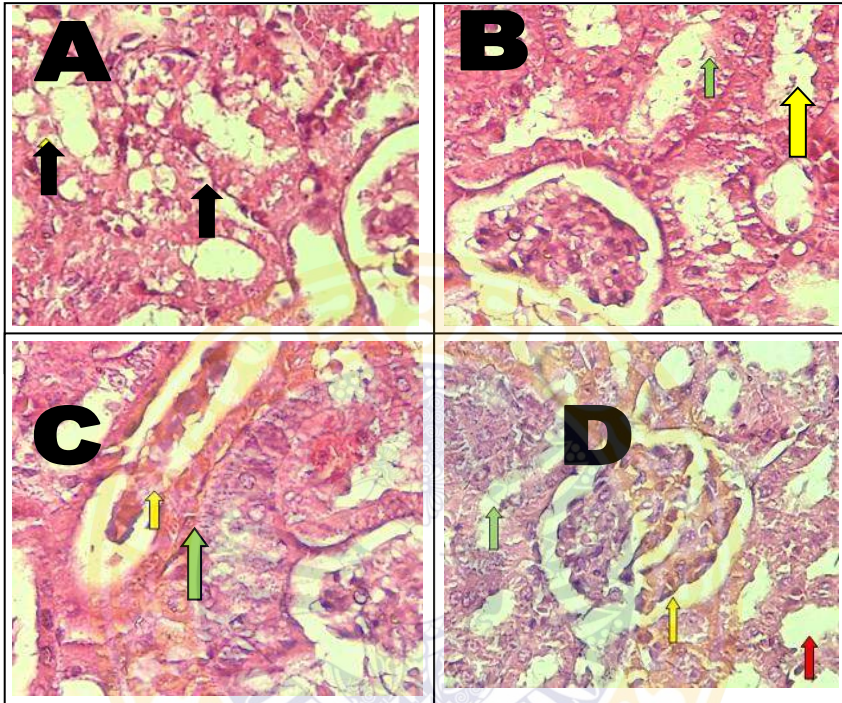
5.7.2. Pengamatan Degenerasi Hidrofik

Hasil pengamatan adanya degenerasi hidrofik pada ginjal tikus ditunjukkan pada tabel V.12 berikut ini.

Tabel V.12. Hasil Pengamatan Degenerasi Hidrofik

Kelompok	Mean Rank
kontrol negatif	16,50
K1	14,00
K2	11,50
K3	11,50
K4	11,50

Dari hasil analisis statistik non parametrik menggunakan uji Kruskal-Wallis, diketahui bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok ($p > 0.05$).



Gambar 5.3 Hasil pengamatan histopatologi ginjal pewarnaan HE, perbesaran 400 kali. (A) degenerasi hidrofik pada K(-) ; (B) Kelompok 1 mengalami *cellular cast*; (C) kelompok 1 mengalami *granular cast*; (D) ginjal normal kelompok 4; (Panah kuning) glomerulus; (panah hijau) tubulus proksimal; (panah merah) tubulus distal; (panah hitam) degenerasi hidrofik

BAB VI**PEMBAHASAN**

Tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto yang dikembangkan menjadi produk fitofarmaka sebagai antimalaria, selain harus melalui uji efektifitas, harus melalui uji keamanan yaitu dengan melakukan uji toksisitas. Persyaratan tersebut merupakan salah satu usaha untuk melindungi masyarakat dalam hal keamanan penggunaan obat tradisional. Pada penelitian ini telah dilakukan pengujian toksisitas akut pada organ hati dan ginjal tikus wistar jantan. Selain itu, dilakukan pengamatan terhadap adanya kematian hewan uji untuk menentukan nilai LD₅₀, pengamatan gejala toksisitas, pemeriksaan histopatologi organ dan berat relatif organ yaitu hati dan ginjal sebagai data pendukung uji toksisitas akut.

Sambiloto mengandung berbagai senyawa kimia diantaranya flavonoid dan lakton. Komponen utama dari senyawa lakton adalah Androgafolida yang juga merupakan kandungan utama dari tanaman ini dan diduga merupakan senyawa utama yang memiliki aktivitas sebagai antimalaria. Menurut penelitian terakhir, androgafolida memiliki bioavailabilitas tinggi. Setelah pemberian per oral, 20 mg Androgafolid segera diabsorpsi, mencapai puncak plasma dalam waktu 1,5 sampai 2 jam dengan waktu paruh 6,6 jam (Panossian *et al.*, 2000). Oleh karena itu, 4 jam pertama setelah pemberian sediaan uji, hewan coba dipastikan akan memperoleh efek androgafolida dari tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto. Sehingga pengamatan gejala toksisitas dan kemungkinan terjadinya kematian hewan uji dapat dilakukan pada 4 jam pertama setelah pemberian sediaan uji sesuai dengan prosedur dari BPOM RI.

Berdasarkan beberapa penelitian terdahulu, ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) termasuk bahan yang aman dikonsumsi dengan LD₅₀ dari hasil uji toksisitas akut oral yaitu >17 g/Kg BB (Hossain *et al.*, 2012). Berdasarkan hal tersebut, maka ekstrak sambiloto tergolong memiliki toksisitas yang rendah. Menurut panduan uji toksisitas dari OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*), suatu bahan yang memiliki toksisitas rendah dapat dilakukan uji toksisitas akut dengan mengikuti prinsip uji batas atau *limi test*. Pada uji toksisitas akut, uji batas ini menggunakan maksimal 5 hewan coba tiap kelompok dengan batas dosis tertinggi yaitu 2000 mg/kg BB atau 5000 mg/kg BB. Namun karena alasan *animal welfare*, dosis tertinggi 5000 mg/kg BB tidak disarankan kecuali untuk alasan kebutuhan regulasi tertentu (OECD, 2008).

Penentuan LD₅₀ atau *Lethal Dose* 50 dalam penelitian ini dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung jumlah hewan coba tikus yang mati selama uji toksisitas mulai dari 4 jam pertama setelah pemberian sediaan uji, 24 jam pertama setelah pemberian sediaan uji dan tiap 24 jam setelahnya selama 14 hari. Dalam penentuan LD₅₀ ini setiap hewan coba diberi dosis bertingkat yaitu 5 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dan 2000 mg/kg BB. Tidak ditemukan adanya kematian hewan coba selama pengamatan baik pengamatan mulai dari 4 jam pertama setelah pemberian sediaan uji, 24 jam pertama setelah pemberian sediaan uji dan tiap 24 jam setelahnya selama 14 hari. Karena pada semua tingkatan dosis termasuk dosis tertinggi 2000 mg/kg BB tidak ditemukan hewan coba yang mati, maka LD₅₀ dari tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto adalah lebih dari dosis uji batas yaitu lebih dari 2000 mg/kg BB (OECD, 2008). Meskipun pada prinsipnya, metode uji batas tidak dimaksudkan untuk menentukan nilai LD₅₀ secara akurat, tetapi metode ini dapat dijadikan

pedoman untuk mengklasifikasikan bahan atau ekstrak berdasarkan tingkatan dosis dimana hewan masih bertahan hidup (Jothy *et al.*, 2011). Sehingga jika tidak ada kematian hewan coba pada dosis tertinggi 2000 mg/kg BB maka sediaan uji (dalam hal ini adalah tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto) termasuk kategori aman (Ilavarasan *et al.*, 2005; OECD, 2008).

Selain mengamati jumlah kematian hewan uji, pada uji toksisitas akut ini dilakukan pengamatan gejala-gejala toksisitas yang muncul pada 4 jam dan 24 pertama setelah pemberian sediaan uji dan pengamatan dilanjutkan selama 14 hari. Gejala toksisitas yang diamati antara lain: 1. Autonomik seperti hipersekresi hidung, salivasi, diare, keluar air seni; 2. Perilaku, seperti sedasi, gelisah, posisi duduk kepala diatas, sering menjilat-jilat tubuh, terengah-engah, sikap agresif atau defensif; 3. Sensorik, seperti peka terhadap nyeri, peka terhadap bunyi dan sentuhan; 4. Sensorik seperti tremor, lemas, ekor melengkung keatas membentuk huruf S; 5. Mata, seperti midriasis, miosis; 7. Kulit seperti menggigil, edema, bulu rontok dan bengkak.

Selama pengamatan, tidak ditemukan adanya gejala toksisitas baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Namun pada pengamatan hari pertama, pada kelompok dosis 2000 mg/kg BB menunjukkan adanya perbedaan konsistensi feses dibandingkan dengan kelompok kontrol, dosis 5 mg/ kg BB, 50 mg/kg, dan 300 mg kg BB. Pada dosis 2000 mg/kg BB menunjukkan produksi feses yang lebih lembek dan konsistensi yang lebih lunak. Hal ini kemungkinan terjadi karena volume serbuk tablet yang diberikan pada kelompok dosis 2000 mg/kg BB lebih besar dibandingkan kelompok yang lain. Perubahan struktur feses ini

dikaitkan dengan terjadinya diare osmotik. Diare osmotik ini terjadi akibat dari akumulasi zat yang tidak dapat diserap di dalam lumen usus yang menyebabkan tekanan osmotik intraluminal, sehingga terjadi pergeseran cairan ke intestinal. Akumulasi zat yang tidak dapat diserap ini kemungkinan disebabkan karena bahan-bahan tambahan dalam tablet seperti laktosa dan beberapa karbohidrat yang sukar larut (Dipiro *et al.*, 2008). Gangguan pencernaan pada tikus kelompok dosis 2000 mg/kg BB ini ditemukan pada pengamatan hari pertama dan hari kedua. Setelah hari berikutnya (48 jam setelah pemberian bahan uji dan seterusnya), produksi feses kelompok ini sudah normal kembali.

Selama pengamatan uji toksisitas akut, berat badan tikus dikontrol dan dimonitor secara berkala setiap tiga hari sekali. Secara umum, perubahan berat badan pada hewan coba akan menggambarkan toksisitas yang terjadi setelah paparan bahan toksik/toksikan. Perubahan berat badan merupakan indikator terjadinya efek samping suatu obat maupun senyawa kimia dan menurun secara signifikan apabila berat badan turun 10% dari berat awal. Dari hasil pengamatan, menunjukkan bahwa berat badan tikus kelompok kontrol, kelompok dosis 5 mg/Kg BB dan 50 mg/kg BB pada pengamatan h1 (hari ke-empat pengamatan) mengalami peningkatan rata-rata berat badan secara berturut-turut yaitu sebesar 5,4 gram, 5 gram dan 5,8 gram. Sedangkan pada dosis 300 mg/kg BB mengalami penurunan rata-rata berat badan sebesar 1,8 gram dan pada dosis 2000 mg/kg BB mengalami kenaikan rata-rata berat badan hanya 2,8 gram. Hal itu disebabkan karena rasa pahit pada tanaman sambiloto yang dapat menurunkan nafsu makan karena pemakaian dosis tinggi pada ekstrak sambiloto (Hossain *et al.*, 2011). Sedangkan pengamatan berat badan tikus pada hari-hari sesudahnya, dimulai dari pengamatan H2 atau pada hari ke-tujuh dan seterusnya, berat

badan kelompok kontrol negatif, dosis 5 mg/Kg BB, 50 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dan 2000 mg/kg BB mengalami kenaikan rata-rata berat badan. Kenaikan berat badan ini tergolong normal karena seiring bertambahnya usia hewan coba. Selain itu, hal ini menunjukkan bahwa pada pengamatan H2 dan seterusnya, nafsu makan tikus kelompok dosis 300 mg/kg BB dan 2000 mg/kg BB sudah kembali normal.

Pada pengamatan h4 (hari ke-13), berat badan seluruh hewan coba pada semua kelompok mengalami penurunan berat badan. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya *intake* makanan yang berkurang dari hari-hari sebelumnya. *Intake* makanan dari hewan coba ini tidak dipengaruhi oleh bahan uji melainkan bergantung dari ketersediaan makanan yang ada di dalam kandang. Pada hari ke-14, semua berat badan tikus mengalami peningkatan karena ketersediaan makanan sudah terpenuhi seperti hari-hari sebelumnya.

Dari hasil analisis statistik, diketahui bahwa tidak ada perbedaan bermakna pada perubahan berat badan tikus antar kelompok pada hari pertama dan hari ke-14 pengamatan ($p > 0,05$). Sehingga tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto tidak mempengaruhi berat badan hewan coba.

Hati merupakan organ tubuh terbesar dan organ metabolisme yang paling kompleks di dalam tubuh dan sangat rentan terhadap pengaruh senyawa-senyawa kimia. Menurut Wulandari (2008), hati sering mengalami kerusakan akibat masuknya bahan toksik. Sekitar 80% suplai darah ke hati berasal dari saluran pencernaan, maka bahan-bahan toksik yang diabsorpsi usus akan dibawa ke hati melalui vena porta. Bahan toksik dapat menyebabkan bermacam-macam jenis efek toksik seperti steatosis, nekrosis, kolestasis, dan sirosis. Organ tubuh ini terlibat dalam metabolisme

zat makanan dan sebagian besar obat dan toksikan (Lu, 2009). Oleh sebab itu, hati menjadi organ yang sangat potensial menderita keracunan terlebih dahulu sebelum organ lain (Robbin dan Kumar, 1995).

Patologi hati sangat erat kaitannya dengan bahan makanan dan minuman yang dikonsumsi oleh suatu individu. Perubahan struktur histologi pada hati dapat dipengaruhi oleh masuknya jumlah dan jenis senyawa tertentu ke dalam organ hati, karena senyawa-senyawa yang masuk ke dalam tubuh akan mengalami absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi di dalam tubuh (Guyton dan Hall, 2006). Oleh karena itu pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik organ hati juga dilakukan dalam penelitian ini.

Selain hati, ginjal juga merupakan salah satu organ vital yang memiliki peran penting yaitu sebagai jalur utama ekskresi sebagian besar toksikan. Ginjal menerima kurang lebih 25% darah dari jantung. Hal ini mengakibatkan ginjal mempunyai volume aliran darah yang tinggi, menyaring dan mengkonsentrasi toksikan pada filtrat oleh glomerulus, membawa toksikan melalui sel tubulus dan dapat mengaktifkan toksikan tertentu (Lu, 2009). Berdasarkan hal tersebut maka perubahan-perubahan organ ginjal secara makroskopik dan mikroskopik juga diamati pada penelitian ini.

Pada hari terakhir pengamatan semua hewan coba yang masih hidup dikorbankan lalu dilakukan pembedahan untuk melihat organ hati dan ginjal secara makroskopik maupun mikroskopik. Organ hati dan ginjal yang telah diambil kemudian ditimbang, dilihat keadaan makroskopik dan perbedaan warnanya dengan kelompok kontrol. Perbedaan warna perlu diamati karena adanya beberapa penyebab tertentu seperti kongesti pada

jaringan atau organ hati. Kongesti adalah peningkatan cairan pada suatu tempat yang terjadi karena proses yang disebabkan kegagalan aliran cairan keluar dari jaringan, misalnya pada kerusakan vena. Jika dilihat secara visual, maka daerah jaringan atau organ yang mengalami kongesti akan berwarna lebih merah atau ungu. Terdapat dua mekanisme terjadinya kongesti, yaitu kenaikan jumlah darah yang mengalir ke daerah tersebut dan penurunan jumlah darah yang mengalami peradangan (Greaves, 2000). Dari hasil pengamatan makroskopik organ hati, tidak ditemukan adanya perbedaan warna organ hati kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Secara visual, warna organ hati pada semua kelompok sama yaitu berwarna merah segar.

Berat relatif organ juga merupakan indeks penting untuk melihat keadaan fisiologis dan patologi organ tubuh hewan coba setelah paparan bahan toksik. Berat relatif organ merupakan hal yang mendasar untuk mendiagnosis ada tidaknya kerusakan organ karena reaksi metabolisme bahan toksik (Jothy *et al.*, 2011). Berat relatif organ ini diperoleh dari hasil berat organ basah terhadap berat badan tikus. Dari hasil perhitungan berat relatif organ hati kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan tidak ada perbedaan secara signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan setelah diuji dengan analisis *one way* anova. Didapatkan hasil signifikansi $p > 0.05$, Sehingga diperoleh hasil bahwa pemberian tablet fraksi etil-asetat 96 herba sambiloto tidak mempengaruhi organ hati secara makroskopik pada uji toksisitas akut.

Dari pengamatan makroskopik organ ginjal, hasil perhitungan berat relatif organ untuk ginjal juga tidak menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Hal ini

dibuktikan dengan analisis uji statistik *one way* anova dengan hasil signifikansi $p > 0.05$. Menunjukkan bahwa pemberian tablet fraksi etil-asetat 96 herba sambiloto tidak mempengaruhi organ ginjal secara makroskopik pada uji toksisitas akut.

Selain pemeriksaan makroskopik, pemeriksaan mikroskopik organ hati juga dilakukan yaitu dengan cara melihat gambaran histopatologi hati tikus yang telah diberi bahan uji menggunakan mikroskop cahaya. Berdasarkan hasil pengamatan pada preparat hati tikus melalui lima lapang pandang, menunjukkan adanya perubahan histopatologi organ hati berupa kongesti, dilatasi sinusoid, dan oedema namun derajat kerusakan termasuk kategori ringan yaitu kurang dari 30%. Pada hasil pengamatan histopatologi hati tidak ditemukan adanya nekrosis. Dari hasil uji analisis statistik non parametrik metode Kruskal-Wallis, diperoleh nilai signifikansi $p > 0.05$, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan secara bermakna pada perubahan histopatologi hati antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan pada uji toksisitas akut ini.

Kongesti, dilatasi sinusoid dan oedema yang ditemukan pada pemeriksaan histopatologi hati tikus termasuk dalam kategori yang ringan karena kerusakan tidak lebih dari 30%. Kongesti dan dilatasi sinusoid yang terjadi sering dikaitkan dengan adanya kerusakan aliran pada pembuluh darah vena. Kerusakan ini dapat terjadi pada tingkatan pembuluh vena hepatika kecil dan vena hepatika besar atau penyakit jantung dan sering disertai dengan atrofi hepatosit (Sanjay *et al.*, 2004).

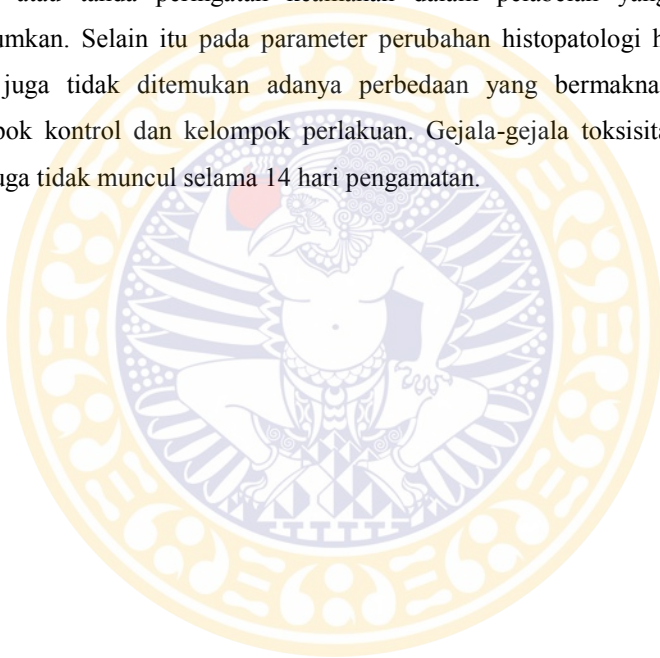
Sedangkan oedema terjadi karena adanya gangguan biokimiawi yang disebabkan oleh iskemi, anemia, metabolisme abnormal dan zat kimia yang bersifat toksik. Hal ini menyebabkan membran sel normal akan

mengalami kerusakan sehingga keseimbangan pengeluaran K^+ dan pemasukan ion Na^+ , Ca^+ dan air akan terganggu. Kerusakan membran sel akan menyebabkan peningkatan jumlah air ke dalam sel, sehingga menyebabkan sitoplasma menjadi bengkak dan dipenuhi butiran-butiran air. Apabila kerusakan membran sel terus berlangsung, maka sitoplasma sel akan berisi cairan yang membentuk vakuola-vakuola, sehingga sitoplasma terlihat lebih pucat, keadaan ini dinamakan degenerasi hidropis (Cheville, 1999).

Berdasarkan hasil pengamatan pada preparat histopatologi ginjal tikus yang telah diberi bahan uji melalui lima lapang pandang, menunjukkan adanya perubahan histopatologi organ ginjal berupa *granular cast*, *cellular cast*, dan degenerasi hidrofik namun derajat kerusakan termasuk kategori ringan yaitu kurang dari 30%. Pada hasil pengamatan histopatologi ginjal tidak ditemukan adanya nekrosis. Dari hasil uji analisis statistik non parametrik metode Kruskal-Wallis, diperoleh nilai signifikansi $p > 0.05$, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan secara bermakna pada perubahan histopatologi ginjal antar kelompok pada uji toksisitas akut ini.

Penyebab yang paling umum terjadi pada kerusakan ginjal adalah kerusakan pada epitel tubulus. Kerusakan sel tubulus yang utama paling sering karena iskemi, bahan toksik atau keduanya. Kerusakan sel ini mengganggu fungsi epitel, fungsi reabsorpsi normal dan dapat menyebabkan obstruksi pada lumen tubulus. Pengelupasan kulit sel, sel utuh, fragmen sel dan debris dapat dilihat pada sedimen urin dan terbentuklah *cast* (Lorrain dan Chyntia, 2015).

Dari hasil penelitian diatas dapat disimpulkan bahwa penggunaan tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto relatif aman berdasarkan uji toksisitas akut dilihat dari nilai LD_{50} yaitu lebih dari 2000 mg/kg BB. Menurut GHS (*The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) disebutkan bahwa diatas dosis 2000 mg/kg BB termasuk dalam kategori toksisitas yang rendah dan sudah tidak terdapat simbol atau tanda peringatan keamanan dalam pelabelan yang perlu dicantumkan. Selain itu pada parameter perubahan histopatologi hati dan ginjal juga tidak ditemukan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Gejala-gejala toksisitas pada tikus juga tidak muncul selama 14 hari pengamatan.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto tidak menyebabkan efek toksik akut pada hati tikus wistar jantan.
2. Tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto tidak menyebabkan efek toksik akut pada ginjal tikus wistar jantan
3. Dari hasil pengamatan kematian hewan coba, diperoleh LD₅₀ dari tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto adalah lebih dari 2000 mg/kg BB serta tidak ditemukannya gejala toksisitas pada hewan coba. Sehingga secara keseluruhan tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto termasuk dalam kategori aman.

7.2. Saran

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya adalah:

1. dilakukan uji toksisitas lebih lanjut terhadap tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto seperti uji toksisitas subkronik untuk mengetahui toksisitasnya untuk pemakaian jangka panjang dan uji teratogenik untuk mengetahui efeknya terhadap janin.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, S., 2011. *Andrographis paniculata*: a review of pharmacological activities and clinical effects. *Alternative Medicine Review*, vol. 16, no. 1, p. 66–77
- Akbarsha, M.A., dan Murugaian, P., 2000. Aspects of the male reproductive toxicity/male antifertility property of andrographolide in albino rats: effect on the testis and the cauda epididymidal spermatozoa. *Phytotherapy Research*, vol. 14, no. 6, p. 432–435.
- Akowi, G.A., Zhari, I., and Mariam, A., 2008. Analysis of urinary andrographolides and antioxidant status after oral administration of *Andrographis paniculata* leaf extract in rats. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no. 12, p. 3616–3620.
- Arsad, S.S., Norhaizan, M.E., Hazilawati H., dan Fauziah O., 2013. Evaluation of acute, subacute and subchronic oral toxicity of *Raphidophora decursiva* (Roxb.) shoot extract in male Sprague Dawley rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol 7, no.41.
- Arsad, S.S., Norhaizan, M.E., Hazilawati H., dan Fauziah O., 2014. Histopathologic change in liver and kidney tissues from male Sprague Dawley rats treated with *Raphidophora decursiva* (Roxb.) shoot extract. *J Cytol Hystol* S4: 001. Doi: 10.4172/2157-7099.S4001.
- Asante, K., 2002. *Public Health Risk Assessment for Human Exposure to Chemicals*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.
- Azlan, A., Younis, L., Mahmud, N.H. dan Dardiri, N.A., 2013. Mechanism of action of *Andrographis paniculata* as antiatherosclerotic agent. *European International Journal of Science and Technology*, Vol. 2 no. 2, p. 1-6.
- BPOM RI, 2014. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara In Vivo. nomor 7. p. 1-26.
- Cheville, N.F., 1995. *Introduction of Veterinary*. Edisi ke-2. Iowa : Iowa State University Press p. 5-25
- Departemen Kesehatan RI, 1993. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia. Nomor: 760-761/Menkes/Per/IX/1992 tentang Fitofarmaka. Departemen Kesehatan, Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 1979. *Materia Medika Indonesia* Jilid II. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dua, V.K., Ojha, V.P., Roy, R., Joshi, B.C., Valecha, N., C., Usha Devi, Bhatnagar, M.C., Sharma, V.P., dan Subbarao, S.K., 2004. Anti-

- malarial activity of some xanthenes isolated from the roots of *Andrographis paniculata*. *Journal Ethnopharmacol.* 95 (2-3) 247-51.
- Elfahmi, Herman, J., Woerdenbag, dan Oliver K., 2014. Jamu: Indonesian traditional herbal medicine towards rational phytopharmacological use. *Journal of Herbal Medicine*.
- Eroschenko, V. P., 2010. *Atlas Histologi di Fiore dengan Korelasi Fungsional Edisi 11*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Ganong, W. F., 200. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Terjemahan dari : *Review of Medical Physiology*. Penerjemah: Widjajahkusumah D. San Fransisco : University of Californi, p. 486
- Gupta, S., J. N Yadava dan J.S Tandon. 1993. Antisecretory (antidiarrhoeal) activity of indian medicinal plants against *Eschericia coli* enterotoxin-induced secretion in rabbit and guinea pig ileal loop models. *International Journal of Pharmacognosy*, vol.31 no.3, p. 198-204.
- Guyton, A.C dan Hall, J.E., 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, edisi ke-II*. Alih bahasa oleh Irawati *et al.*, Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Harada, T., Enotomo., Boorman, G., dan Marompot, R.R., 1999. *Liver and Gallbladder. In: Marompot RR. Pathology of The Mouse. Reference and Atlas*. 1st Edition. Cache River Press, p. 120-171
- Harjotaruno, S., Widyawaruyanti, A., and Zaini, N.c., 2008. Apoptosis inducing effect of androgapholide on TD-47 human breast cancer cell line. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. Vol.4, no.3 p. 345-351.
- Himawan, S., 1994. *Patologi Edisi-1*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, p. 226-249
- Hossain, S., Zannat, U., Abubakar, dan S., Hafizur R. 2014. *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees: A review of ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology. *Scientific World Journal* Volume 2014, Article ID 274905
- Humber, J.M. 2002. The role of complementary and alternative medicine: acomodating pluralism. *J. Am. Med. Assoc.* 288, p. 1655-1656.
- Iruretagoyena, M.I., Tobar, J. A., Gonz'alez, P. A., 2005. Androgapholide interferes with T cell activation and reduces experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 312, no. 1, p. 366-372.

- Jarukamjorn, K., Nemoto N., 2008. Pharmacological Aspect of *Andrographis paniculata* on Health and Its major Diterpenoid Constituent Andrographolide. *Journal of Science*.
- Jothy, Zakaria, Chen, Yee Ling Lau, Latha dan Sasidhran, 2011. Acute oral toxicity of methanolic extract of *Cassia Fistula* in Mice. *Molecules* 2011, 16, 5268-5282.
- Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., and Peter,C., 1993. *Pathology of Domestic Animal*. London: Academic Press, p. 325-346.
- Katno dan Pramono, S., 2002. *Tingkat Manfaat dan Keamanan Tanaman Obat dan Obat Tradisional*. Yogyakarta: balai Penelitian Tanaman Obat Tawangmangu Fakultas Farmasi UGM.
- Koqure, K., Ishizaki, M., Nemoto, M., Kuwano, H., Makuuchi, M., 1999. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreas*. 6 (2): 171-5.
- Kusumawati, Diah., 2004. Bersahabat dengan Hewan Coba. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press
- Lin, F.L., Wu, S.J. dan Lee, S.C., 2009. Antioxidant, antioedema and analgesic activities of *Andrographis paniculata* extracts and their active constituent andrographolide. *Phytother Res*, Vol. 23 no.7, p. 958-64.
- Loomis, T.A., 1978. *Toksikologi Dasar*. Edisi Ketiga. Lea and Febiger Philadelphia: p. 195-235
- Lorrain dan Chyntia, 2016. http://basic.shsmu.edu.cn/jpkc/pathology/6/sydx/adk1_09.pdf. diakses pada tanggal 6 Agustus 2016.
- Lu, F.C., 1995. *Toksikologi Dasa : Asas,Organ Sasaran, dan penilaian resiko*, edisi 2. Jakarta: Universitas Indonesia Press, p. 85-100
- Mahendra, B., 2005. *13 Jenis Tanaman Obat Ampuh*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Mishra K, Dash A.P., Swain, B.K., Dey,N., 2009. Antimalarial activities of *Andrographis paniculata* and *Hedyotis corymbosa* extracts and their combination with curcumin. *Malaria Journal*; vol.26 no.8, p 1-9.
- Mishra K, Dash, A.P., Dey, N., 2011. Andrographolide : A novel antimalaria diterpene lactone compound from *Andrographis paniculata* and its Interaction with curcumin and Artesunate. *J Trop Med*; 1-6.
- Mulyono, A., Ristiyanto, dan Soesanti, N., 2009. Karakteristik histopatologi hepar tikus got *Rattus norvegicus* infeksi *Leptospira sp.*, *Jurnal Vektora* Vol.1 no.2
- Nanduri, S., Nyavanandi, V.K., Sanjeeva R., 2004. Synthesis and structure-activity relationships of andrographolide analogues as novel

- cytotoxic agents, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 14, no. 18, p. 4711–4717.
- Nassar, M., Eндarjo, S., dan Handjani, R.D., 2008. *Pedoman Penanganan Bahan Pemeriksaan untuk Histologi*. Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia (IAIP). PT Roche Indonesia. p. 9-13.
- Nugroho, A.E., Andrie, M., Warditiani, K., Siswanto, E., Pramono, S. & Lukitaningsih, E., 2012. Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees and andrographolide in high-fructose-fat-fed rats. *Indian Journal Pharmacol*, Vol. 44 no.3, p. 377-381.
- OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*), 2008. <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/ocedtg425.pdf>. diakses pada tanggal 23 Juli 2016.
- Oghbonnia, S.O., Odimegwu, J.I dan Enwuru, V. N., 2008. Evaluation of hypoglycemic and hypolipidaemic effect of aqueous of ethanolic extracts of *Treulia africana* Decne and *Bryophyllum pinnatum* Lam. and their mixture on streptozocin (STZ)-induced diabetic rats. *Afr J Biotechnol* vol.15 no.7 p. 2535-2539
- Panossian, A., Ovhanisyan, A. Dan Mamikonyan, G. (2000). Pharmacokinetic and Oral Bioavailability of Andrographolide from *Andrographis paniculata* Fixed Combination Kan Jangin Rats and Human. *Phytomedicine*. 7(5):351–364
- Pramono, E., 2002. The commercial use of traditional knowledge and medicinal plants in Indonesia. Submitted for Multi-stakeholder Dialogue on Trade, Intellectual Property and Biological Resources in Asia.
- Prapanza, E. dan Marianto, L.M., 2003. *Khasiat & Manfaat Sambiloto: Raja Pahit Penakluk Aneka Penyakit*. Jakarta: AgroMedia Pustaka. P. 3-9
- Price, S.A. dan Wilson, L., 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses Penyakit*. Alih Bahasa : Brahm U. Pendit, et al. Editor : Huriawati Hartanto, et al. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Purnomo, B.B., 2012. *Buku Kuliah Dasar – Dasar Urologi*. Jakarta: CV Infomedika.
- Rachman, N.N.N.A., Furuta, T., Kojima, S., Takane, A., dan Ali, M.M., 1999. Antimalarial activity of extracts of Malaysian medicinal plants. *Ethnopharmacol*; vol.3 no. 64 p. 294-54
- Ridley, R.G., 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*; 415 p. 686-93

- Robbins, S.L., 2007. *Buku Ajar Patologi*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Sanjay Kakar, MD; Patrick S. Kamath, MD; Lawrence J. Burgart, MD, 2004. Sinusoidal Dilatation and Congestion in Liver Biopsy. *Arch Pathol Lab Med*—Vol 128, August 2004
- Sharp, E.P. dan Regina, M.C.L., 2010. *The Laboratory Rat :Laboratory Animal Pocket Reference*. Washington: taylor& Francis.
- Sheeja, K., Shihab, P.K., dan Kuttan, G., 2006. Antioxidant and antiinflammatory activities of the plant *Andrographis paniculata* Nees. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, vol. 28, no.1, p. 129–140.
- Siavanathan, M., dan Elamaran, M., 2013. Medical and pharmacological properties of *Andrographis paniculata*. *International Journal of Biomolecule and Biomedicine (IJBB)*. Vol.3 no.2, p.1-12
- Soeksmanto, A., 2006. Pengaruh ekstrak butanol buah tua mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap jaringan ginjal mencit (*Mus Musculus*). Bogor:Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).
- Song, Y., Liu,S.P., Jin, Z., Qin J., dan Jiang, Z., 2013. Qualitative and quantitative analysis of *Andrographis paniculata* by rapid resolution chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Molecules*, Vol.18. ISSN 1420-3049
- Subramanian, R., Asmawi M. Z., dan Sadikun, A., 2008. In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide, *ActaBiochimica Polonica*, vol. 55, no. 2, pp. 391–398.
- Suckow, M. A., Weisbroth, S. H., dan Franklin, C.L., 2006. *The Laboratory Rat*. Second Edition. USA: Elsevier Academic Press.
- Sukandar, E.Y., 2006. Tren dan paradigma dunia Farmasi, industri-klinik-teknologi kesehatan, disampaikan dalam orasi ilmiah Dies Natalis ITB. http://itb.ac.id/focus/focus_file/orasi-ilmiah-dies-45.pdf. Diakses Desember 2015.
- Suyanti, L., 2008. Gambaran histopatologi hati dan ginjal tikus pada pemberian fraksi asam amino non-protein lamtoro merah (*Acacia villosa*) pada uji toksisitas akut. Skripsi. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Syamsuhidayat, S.S., dan Hutapea, J.R. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*: Jilid I. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, p. 54-55.

- Tan, B.H., and Zhang, A., 2004. *Andrographis paniculata* and the cardiovascular system. *Oxidative Stress and Disease*, vol. 14, p. 441–456
- Tang, W., dan Eisenbrand G., 1992. *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, in Chinese drugs of plants origin chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine, W. Tang and G Eisenbrand, Eds., p. 97-103, Springer, Berlin, Germany, 1992
- Visen P.K.S., B. Saraswat, V. Vuksan, and B.N. Dhawan, "Effect of andrographolide on monkey hepatocytes against galactosamine induced cell toxicity: an in-vitro study," *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, vol. 4, no. 1, article 10, 2007.
- Widyawaruyanti, A., Hafid A.F., Radjaram, A., Tantular, I., 2011. Pengembangan produk fraksi etil asetat sambiloto kombinasi dengan artesunat sebagai terapi antimalaria. laporan penelitian hibah riset unggulan, LPPM Universitas Airlangga.
- Widyawaruyanti, A., Asrory, M., Ekasari, W., Setiawan, D., Radjaram, A., Tumewu, L., Hafid, A.F., 2014. In vivo antimalarial activity of *Andrographis paniculata* tablets. *Procedia Chemistry* no.13, p. 101-104.
- Widyawaruyanti, A., Hafid, A.F., Tantular, I.S., 2015. Aplikasi klinik tablet fraksi etil asetat herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) pada terapi malaria. Laporan Akhir Penelitian Unggulan Strategis Nasional.
- Wijayakusuma, H.M., 1994. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia: Jilid 2*. Jakarta: Pustaka Kartini.
- Wongkittipong, R., 2000. Solid-liquid extraction of andrographolide from plant-experimental study, kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology*, Vol. 40. p. 147-154.

LAMPIRAN 1
KETERANGAN KELAIKAN ETIK



KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Animal Care and Use Committee (ACUC)

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ETHICAL CLEARANCE”

No : 489-KE

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :

PENELITIAN BERJUDUL : Aplikasi Klinik Tablet Fraksi Etil Asetat Herba Sambiloto
(*Andrographis paniculata*) Pada terapi Malaria

PENELITI UTAMA : Aty Widyawanuyanti

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 5 Agustus 2015

Mengetahui,
Dekan FKH-Unair,



Prof. Romziah Sidik, Ph.D.,drh.
NIP. 195312161978062001

Ketua,



Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes.,Drh.
NIP. 196609201992031003

LAMMPIRAN 2

PERHITUNGAN DOSIS ANDROGAFOLIDA

Perhitungan dosis Androgafolida tiap tablet

tablet dengan bobot $650 \pm 5\%$ mg mengandung ± 167.5 mg fraksi etil asetat-96 (setara dengan ± 35 mg Androgafolida) per tablet.

Sedangkan dosis efektif tablet fraksi etil asetat-96 herba sambiloto sebagai antimalaria untuk manusia adalah 140 mg Androgafolida, jika dikonversi ke dosis tikus dengan faktor konversi 0.018 adalah **2.52 mg** Androgafolida.

Kandungan Androgafolida tiap dosis untuk tiap tikus (berat badan 200 g):

1. Dosis 5 mg/kg BB
 $\text{Androgafolida} = 5 \text{ mg}/650 \text{ mg} \times 35 \text{ mg} = 0.27 \text{ mg Androgafolida/kg BB}$
 $\text{Dosis Androgafolida tiap tikus} = 200 \text{ mg}/1000 \text{ mg} \times 0.27 \text{ mg} = 0.054 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$
2. Dosis 50 mg/kg BB
 $\text{Androgafolida} = 50 \text{ mg}/650 \text{ mg} \times 35 \text{ mg} = 2.7 \text{ mg Androgafolida/kg BB}$
 $\text{Dosis Androgafolida tiap tikus} = 200 \text{ mg}/1000 \text{ mg} \times 2.7 \text{ mg} = 0.54 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$
3. Dosis 300 mg/kg BB
 $\text{Androgafolida} = 300 \text{ mg}/650 \text{ mg} \times 35 \text{ mg} = 16.15 \text{ mg Androgafolida/kg BB}$
 $\text{Dosis Androgafolida tiap tikus} = 200 \text{ mg}/1000 \text{ mg} \times 16.15 \text{ mg} = 3.23 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$
4. Dosis 2000 mg/kg BB
 $\text{Androgafolida} = 2000 \text{ mg}/650 \text{ mg} \times 35 \text{ mg} = 107.69 \text{ mg Androgafolida/kg BB}$
 $\text{Dosis Androgafolida tiap tikus} = 200 \text{ mg}/1000 \text{ mg} \times 107.69 \text{ mg} = 21.54 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$

LAMPIRAN 3

GAMBAR PROSES PEMBERIAN BAHAN UJI



Sambiloto



**Penimbangan berat Badan
Sebelum Pemberian Bahan
Uji**



**Pemberian Suspensi Tablet Fraksi
EA-96 Sambiloto sebanyak 2ml/200 g**

TABEL KONVERSI DOSIS

	Mouse 20 g	Rat 200 g	Guinea pig 400 g	Rabbit 1.5 kg	Cat 2 kg	Monkey 4 kg	Dog 12 kg	Man 70 kg
Mouse 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Rat 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Guinea pig 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Rabbit 1.5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Cat 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Monkey 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Dog 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Man 70 kg	0,0026	0,0018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Dikutip dari: Ghosh, 1971. **Fundamental of Experimental Pharmacology**. Calcutta: Scientific Book Agency. P.85

LAMPIRAN 5

VOLUME MAKSIMUM OBAT YANG DIBERIKAN PADA HEWAN COBA

Binatang	Volume Maksimum dalam ml				
	Intravena	Intra muscular	Intra peritomial	Subcutan	Peroral
Mencit 20-30 g	0,5	0,05	1,0	0,5-1,0	1,0
Tikus 100 g	1,0	0,1	2,0-5,0	2,0-5,0	5,0
Tupai 50 g	-	0,1	1,0-2,0	2,5	2,5
Marmut 250 g	-	0,25	2,0-5,0	5,0	10,0
Merpati 300 g	2,0	0,5	2,0	2,0	10,0
Kelinci 2,5 kg	5,0-10,0	0,5	10,0-20,0	5,0-10,0	20,0
Kucing 3 kg	5,0-10,0	1,0	10,0-20,0	5,0-10,0	50,0
Anjing 5 kg	10,0-20,0	5,0	20,0-50,0	10,0	100,0

Dikutip dari: Ritschel, W.A., 1974. **Laboratory Manual of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**. Drug Intelligence Inc

LAMPIRAN 6

DATA SURVIVAL RATE TIKUS

Kelompok	R	Survial Rate														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
K(-)	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Rerata		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
K1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Rerata		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
K2	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Rerata		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
K3	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Rerata		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
K4	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Rerata		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Keterangan:

1 :terhitung mulai tanggal 7 Nopember 2015

15 : hari terakhir pengamatan, tanggal 21 Nopember 2015

Hasil : tidak ada kematian hewan coba sampai akhir pengamatan yaitu selama 14 hari.



LAMPIRAN 7

TABEL HASIL PENGAMATAN GEJALA TOKSISITAS

Waktu pengamatan : 4 jam pasca terapi (7 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H1 (8 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Feses lembek
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H2 (9 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H3 (10 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H4 (11 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H5 (12 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H6 (13 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H7 (14 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H8 (15 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H9 (16 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H10 (17 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H11 (18 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H12 (19 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
---	-------	--------	--------	--------	--------	--------

Waktu pengamatan : H13 (20 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Waktu pengamatan : H14 (21 Nopember 2015)

No	Kriteria	Kelompok				
		K(-)	K1	K2	K3	K4
1	Perilaku	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Autonomik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Sensorik	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Neuromuskular	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Mata	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Kulit	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Hal-hal yang perlu diamati antara lain:

2. Autonomik : hipersekresi hidung, salivasi, diare,
3. Perilaku : sedasi, gelisah, posisi duduk kepala diatas, sering menjilat-jilat tubuh, terengah-engah, sikap agresif atau defensif
4. Sensorik : peka terhadap nyeri, peka terhadap bunyi dan sentuhan

5. Sensorik : Tremor, lemas, ekor melengkung keatas membentuk huruf S
6. Mata : midriasis, miosis
7. Kulit : menggigil, edema, bengkak.



LAMPIRAN 8

Tabel Kategori Toksisitas Akut berdasarkan LD50

Acute toxicity	Cat 1	Cat 2	Cat 3	Cat 4	Category 5
Oral (mg/kg)	≤ 5	> 5	> 50	> 300	Criteria: • Anticipated oral LD50 between 2000 and 5000 mg/kg; • Indication of significant effect in humans; [*] • Any mortality at class 4; [*] • Significant clinical signs at class 4; [*] • Indications from other studies. [*] [*] If assignment to a more hazardous class is not warranted.
Dermal (mg/kg)	≤ 50	> 50	> 200	> 1000	
Gases (ppm)	≤ 100	> 100	> 500	> 2500	
Vapors (mg/l)	≤ 0.5	> 0.5	> 2.0	> 10	
Dust & mists (mg/l)	≤ 0.05	> 0.05	> 0.5	> 1.0	
		≤ 50	≤ 300	≤ 2000	
		≤ 200	≤ 1000	≤ 2000	
		≤ 500	≤ 2500	≤ 5000	
		≤ 2.0	≤ 10	≤ 20	
		≤ 0.5	≤ 1.0	≤ 5	

GHS (*Globally Harmonized System*) classification, 2015

LAMPIRAN 9

DATA BERAT RELATIF ORGAN

Kelompok	No.	Hati (%)	Ginjal (%)
K(-)	1	5,18	0,99
	2	5,17	0,76
	3	4,38	0,76
	4	4,12	0,77
	5	4,49	0,74
rerata		4,67 ± 0,48	0,80 ± 0,10
K1	1	3,73	0,69
	2	3,96	0,73
	3	4,70	0,77
	4	3,45	0,79
	5	4,34	0,80
rerata		4,04 ± 0,49	0,76 ± 0,04
K2	1	4,02	0,78
	2	4,39	0,81
	3	4,11	0,70
	4	4,20	0,85
	5	4,97	0,79
rerata		4,34 ± 0,38	0,79 ± 0,06
K3	1	3,80	0,75
	2	4,05	0,73
	3	4,27	0,74
	4	4,13	0,74
	5	4,35	0,72
rerata		4,12 ± 0,21	0,74 ± 0,01
K4	1	4,23	0,71
	2	4,26	0,83
	3	3,47	0,61
	4	4,75	0,93
	5	4,52	0,78
rerata		4,26 ± 0,48	0,77 ± 0,12

LAMPIRAN 10
UJI NORMALITAS DATA BERAT RELATIF ORGAN HATI DAN
GINJAL

NPar Tests**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		beratrelatifhati	beratrelatifginjal
N		25	25
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4,2816	,7708
	Std. Deviation	,44698	,07555
Most Extreme Differences	Absolute	,124	,160
	Positive	,124	,160
	Negative	-,079	-,102
Kolmogorov-Smirnov Z		,621	,798
Asymp. Sig. (2-tailed)		,835	,547

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

LAMPIRAN 11
ANALISIS ONE WAY ANOVA DATA BERAT RELATIF ORGAN
HATI TIKUS

Oneway**Descriptives**

Berat relatif organ Hati

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	4,6680	,48194	,21553	4,0696	5,2664	4,12	5,18
2	5	4,0360	,49399	,22092	3,4226	4,6494	3,45	4,70
3	5	4,3380	,37891	,16945	3,8675	4,8085	4,02	4,97
4	5	4,1200	,21378	,09560	3,8546	4,3854	3,80	4,35
5	5	4,2460	,48263	,21584	3,6467	4,8453	3,47	4,75
Total	25	4,2816	,44698	,08940	4,0971	4,4661	3,45	5,18

Test of Homogeneity of Variances

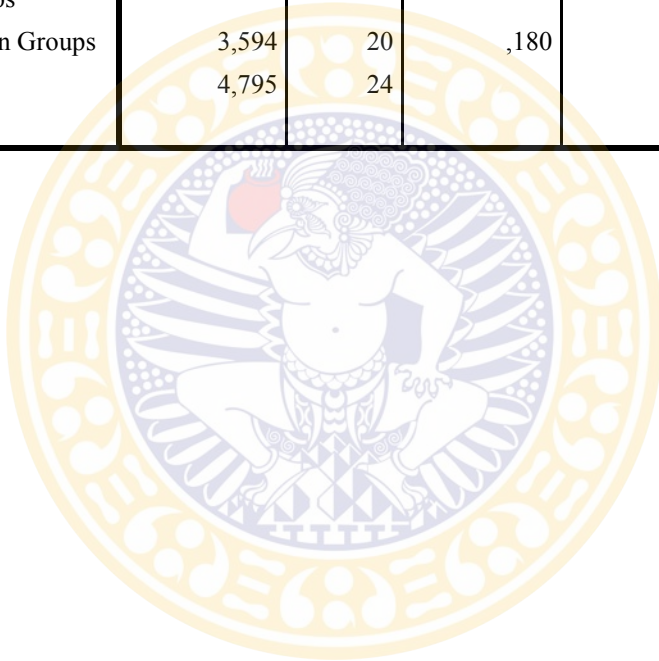
Berat relatif organ Hati

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,980	4	20	,440

ANOVA

Berat relatif organ Hati

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,201	4	,300	1,671	,196
Within Groups	3,594	20	,180		
Total	4,795	24			



LAMPIRAN 12

ANALISIS ONE WAY ANOVA DATA BERAT RELATIF ORGAN
GINJAL TIKUS

Oneway

Descriptives

Berat relatif organ Ginjal

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	,8040	,10455	,04675	,6742	,9338	,74	,99
2	5	,7560	,04561	,02040	,6994	,8126	,69	,80
3	5	,7860	,05505	,02462	,7177	,8543	,70	,85
4	5	,7360	,01140	,00510	,7218	,7502	,72	,75
5	5	,7720	,12091	,05407	,6219	,9221	,61	,93
Total	25	,7708	,07555	,01511	,7396	,8020	,61	,99

ANOVA

Berat relatif organ Ginjal

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	S
Between Groups	,014	4	,003	,561	
Within Groups	,123	20	,006		
Total	,137	24			

LAMPIRAN 13
HASIL SCORING HISTOPATOLOGI HATI

KELOMPOK	Kongesti	Nekrosis	Dilatasi Sinusoid	Oedema (Vakuolisasi Sitoplasma)
K(-) 1	1	0	0	0
2	0	0	2	1
3	1	0	0	0
4	1	0	0	0
5	1	0	0	1
K1 1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	1	0	1	0
K2 1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	1	0	2	1
K3 1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	2	0	1	0
K4 1	0	0	0	0
2	1	0	1	0
3	0	0	0	0
4	2	0	1	0
5	1	0	1	0

LAMPIRAN 14

ANALISIS KRUSKAL-WALLIS HASIL *SCORING*
HISTOPATOLOGI HATI

1. KONGESTI

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank
kongesti	1	5	17,20
	2	5	10,30
	3	5	10,30
	4	5	11,30
	5	5	15,90
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	kongesti
Chi-Square	5,343
df	4
Asymp. Sig.	,254

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

kelompok

2. DILATASI SINUSOID

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
dilatasi_sinusoid	25	,36	,638	0	2
kelompok	25	3,00	1,443	1	5

Kruskal-Wallis Test**Ranks**

	kelompok	N	Mean Rank
dilatasi_sinusoid	1	5	12,50
	2	5	11,80
	3	5	12,50
	4	5	11,80
	5	5	16,40
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	dilatasi_sinusoid
Chi-Square	2,227
df	4
Asymp. Sig.	,694

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

3. OEDEMA

NPar Tests**Descriptive Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
oedema	25	,12	,332	0	1
kelompok	25	3,00	1,443	1	5

Kruskal-Wallis Test**Ranks**

	kelompok	N	Mean Rank
oedema	1	5	16,50
	2	5	11,50
	3	5	14,00
	4	5	11,50
	5	5	11,50
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	oedema
Chi-Square	5,818
df	4
Asymp. Sig.	,213

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

kelompok

4. NEKROSIS

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
nekrosis	25	,00	,000	0	0
kelompok	25	3,00	1,443	1	5

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank
nekrosis	1	5	13,00
	2	5	13,00
	3	5	13,00
	4	5	13,00
	5	5	13,00
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	nekrosis
Chi-Square	,000
df	4
Asymp. Sig.	1,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

kelompok

LAMPIRAN 15
HASIL SCORING HISTOPATOLOGI GINJAL

KELOMPOK	Granular Cast	Cellular Cast	Degenerasi Hidrofik	Nekrosis
K(-)1	1	1	1	0
2	0	0	0	0
3	0	0	1	0
4	0	0	0	0
5	1	0	0	0
K1- 1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	1	0	1	0
K2-1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
K3-1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
K4-1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0

LAMPIRAN 16
ANALISIS KRUSKAL-WALLIS HASIL *SCORING*
HISTOPATOLOGI GINJAL

1. GRANULAR CAST
NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
granular_cast	25	,12	,332	0	1
kelompok	25	3,00	1,443	1	5

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank
granular_cast	1	5	16,50
	2	5	14,00
	3	5	11,50
	4	5	11,50
	5	5	11,50
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	granular_cast
Chi-Square	5,818

df	4
Asymp. Sig.	,213

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: kelompok

2. CELLULAR CAST

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
cellular_cast	25	,04	,200	0	1
kelompok	25	3,00	1,443	1	5

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank
cellular_cast	1	5	15,00
	2	5	12,50
	3	5	12,50
	4	5	12,50
	5	5	12,50
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	cellular cast
Chi-Square	4,000
df	4

Asymp. Sig.	,406
-------------	------

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

kelompok

3. DEGENERASI HIDROFIK

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
degerasi_hidrofi	25	,12	,332	0	1
kelompok	25	3,00	1,443	1	5

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank
degerasi_hidrofi	1	5	16,50
	2	5	14,00
	3	5	11,50
	4	5	11,50
	5	5	11,50
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	degerasi_hidrofi k
Chi-Square	5,818
df	4
Asymp. Sig.	,213

- a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: kelompok

4. NEKROSIS

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
nekrosis	25	3,00	1,443	0	5
kelompok	25	3,00	1,443	1	5

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank
nekrosis	1	5	13,00
	2	5	13,00
	3	5	13,00
	4	5	13,00
	5	5	13,00
	Total	25	

Test Statistics^{a,b}

	nekrosis
Chi-Square	,000
df	4
Asymp. Sig.	1,000

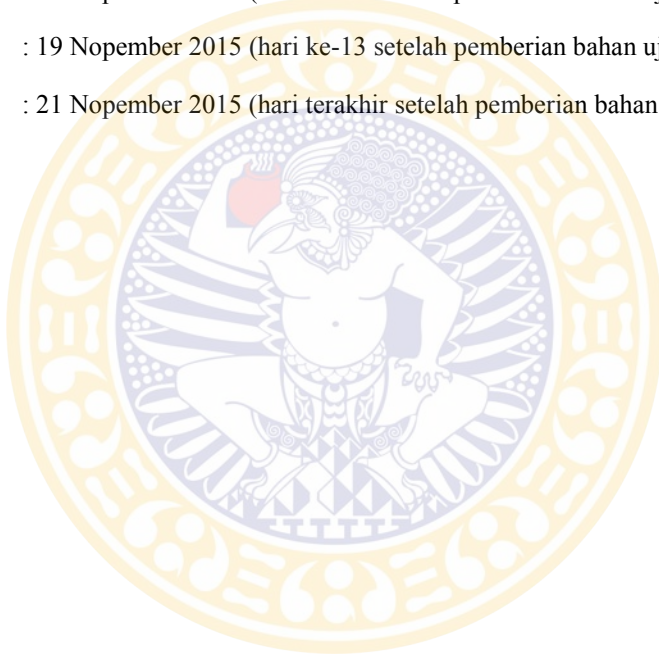
- a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable:
kelompok

LAMPIRAN 17
DATA BERAT BADAN TIKUS

Kelompok	R	H0 (g)	H1 (g)	H2 (g)	H3 (g)	H4 (g)	H5 (g)
K(-)	1	118,0	119,0	119,0	130,0	119,0	127,0
	2	166,0	178,0	187,0	204,0	176,0	186,0
	3	130,0	139,0	150,0	164,0	150,0	164,0
	4	135,0	134,0	137,0	143,0	131,0	139,0
	5	129,0	135,0	146,0	164,0	150,0	157,0
Rerata		135,6	141,0	147,8	161,0	145,2	154,6
K1	1	140,0	144,0	158,0	148,0	141,0	148,0
	2	163,0	169,0	192,0	171,0	170,0	175,0
	3	125,0	133,0	148,0	170,0	138,0	141,0
	4	150,0	152,0	159,0	147,0	141,0	148,0
	5	172,0	177,0	193,0	177,0	169,0	171,0
Rerata		150,0	155,0	170,0	162,6	151,8	156,6
K2	1	132,0	133,0	145,0	141,0	137,0	136,0
	2	120,0	133,0	142,0	146,0	144,0	146,0
	3	139,0	145,0	153,0	156,0	154,0	162,0
	4	153,0	164,0	167,0	168,0	152,0	157,0
	5	153,0	151,0	153,0	148,0	144,0	148,0
Rerata		139,4	145,2	152,0	151,8	146,2	149,8
K3	1	140,0	137,0	146,0	158,0	142,0	148,0
	2	137,0	130,0	145,0	154,0	137,0	141,0
	3	128,0	126,0	141,0	150,0	138,0	145,0
	4	149,0	147,0	162,0	164,0	151,0	152,0
	5	155,0	160,0	171,0	173,0	160,0	164,0
Rerata		141,8	140,0	153,0	159,8	145,6	150,0
K4	1	139,0	151,0	171,0	167,0	158,0	166,0
	2	139,0	142,0	153,0	158,0	146,0	157,0
	3	166,0	163,0	185,0	188,0	172,0	187,0
	4	141,0	142,0	152,0	155,0	140,0	138,0
	5	148,0	149,0	160,0	175,0	151,0	159,0
Rerata		146,6	149,4	164,2	168,6	153,4	161,4

Keterangan:

- H0 : 7 Nopember 2015 (hari pertama pemberian bahan uji)
H1 : 10 Nopember 2015 (hari ke-4 setelah pemberian bahan uji)
H2 : 13 Nopember 2015 (hari ke-7 setelah pemberian bahan uji)
H3 : 16 Nopember 2015 (hari ke-10 setelah pemberian bahan uji)
H4 : 19 Nopember 2015 (hari ke-13 setelah pemberian bahan uji)
H5 : 21 Nopember 2015 (hari terakhir setelah pemberian bahan uji)



LAMPIRAN 18

UJI NORMALITAS BERAT BADAN TIKUS

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
kelompok	25	3,00	1,443	1	5
berat_badan	25	12,68	9,642	1	34

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	kelompok	berat_badan
N	25	25
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3,00
	Std. Deviation	1,443
Most Extreme Differences	Absolute	,156
	Positive	,156
	Negative	-,156
Kolmogorov-Smirnov Z	,779	,843
Asymp. Sig. (2-tailed)	,579	,476

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

LAMPIRAN 19
ANALISIS ONE WAY ANOVA BERAT BADAN TIKUS

Oneway**Descriptives**

berat badan

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	19,00	12,570	5,621	3,39	34,61	4	34
2	5	7,80	6,419	2,871	-,17	15,77	1	16
3	5	12,40	11,104	4,966	-1,39	26,19	4	26
4	5	8,20	5,541	2,478	1,32	15,08	3	17
5	5	16,00	9,274	4,147	4,49	27,51	3	27
Total	25	12,68	9,642	1,928	8,70	16,66	1	34

Test of Homogeneity of Variances

berat badan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,279	4	20	,097

ANOVA

berat badan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	474,640	4	118,660	1,351	,286

Within Groups	1756,800	20	87,840		
Total	2231,440	24			

