

Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) pada Mencit Jantan (*Mus musculus*)

Safira Prasita Dewanti^a, Iswandi^{1a*}, Nur Anggreini Dwi Sasangka^a

^a Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi , Jl Letjen Sutoyo Mojosoongo, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia

¹ iswandi2504@gmail.com*

*korespondensi penulis

Kata kunci:

Uji Toksisitas,
Daun Salam,
LD50,
Thompson weil

ABSTRAK

Penggunaan daun salam di pengobatan tradisional pada dasarnya tidak dapat terlepas dari aspek keamanan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui batas aman penggunaan ekstrak daun salam serta tanda-tanda kualitatif dan kuantitatif pada batas aman LD50. Hewan uji yang digunakan 30 ekor dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yang masing-masing berisi 6 mencit dengan dosis CMC 0,5% dan dosis ekstrak etanol 800; 1600; 3200; dan 6400. Hasil yang didapatkan dengan LD50 berdasarkan penurunan BB hewan uji pada 800 mg mengalami penurunan hingga 15,33 gram, 1600 mg mengalami penurunan hingga 9,16 gram, 3200 mg mengalami penurunan hingga 8,83 gram, dan 6400 mg mengalami penurunan hingga 8,16 gram. Gejala toksik berupa gelisah tertinggi pada kelompok dosis 800 mg, penurunan aktivitas gerak tertinggi pada kelompok dosis 3200 mg, penurunan berat badan tertinggi pada kelompok dosis 3200 mg dan 6400 mg, dan kematian tertinggi pada kelompok dosis 6400 mg. Dosis 800 mg terjadi 20% kematian, dosis 1600 mg dan 3200 mg terjadi 30% kematian, dan dosis 6400 mg terjadi 50% kematian. Nilai r yang didapat yaitu 1,2,2,3 dengan nilai f yaitu 0,50 sehingga nilai LD50 yang diperoleh yaitu 2262,03 dimana termasuk kategori toksik ringan.

Key word:

Toxicity Test,
Bay Leaf,
LD50,
Thompson weil

ABSTRACT

The use of bay leaves in traditional medicine basically cannot be separated from the safety aspect. The purpose of this study was to determine the safe limit for using bay leaf extract as well as the qualitative and quantitative indicators of the safe limit for LD50. 30 test animals were divided into 5 treatment groups, each containing 6 mice at a dose of 0.5% CMC and 800% ethanol extract; 1600; 3200; and 6400. The results obtained with the LD50 based on the decrease in the weight of the test animals at 800 mg decreased to 15.33 grams, 1600 mg decreased to 9.16 grams, 3200 mg decreased to 8.83 grams, and 6400 mg decreased to 8.16 grams. Toxic symptoms in the form of anxiety were the highest in the 800 mg group, the highest decrease in movement activity in the 3200 mg group, the highest weight loss in the 3200 mg and 6400 mg groups, and the highest death in the 6400 mg group. Doses of 800 mg occur in 20% of deaths, doses of 1600 mg and 3200 mg occur in 30% of deaths, and doses of 6400 mg occur in 50% of deaths. The r value obtained is 1,2,2,3 with an f value of 0.50 so that the LD50 value obtained is 2262.03 which is included in the mild toxic category.

Pendahuluan

Indonesia merupakan negara dengan karagaman hayati yang tinggi di dunia. Sekitar 143 juta hektar hutan tropis dengan pulau-pulau yang tersusun dari Sabang hingga Merauke, tempat bernaungnya 80% tanaman obat dunia (Elfahmi et al., 2014).

Salah satu tanaman yang sudah dikenal dan dimanfaatkan oleh warga yaitu Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight)Walp.). Masyarakat sudah menggunakannya menjadi bumbu masakan, dengan tujuan untuk menambah aroma, menambah citarasa, sampai memberi warna (Silalahi, 2017).

Kandungan pada daun salam yang diduga memiliki aktivitas farmakologi antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, terpenoid, minyak atsiri (0,05%), sitral, dan eugenol (Herbie, 2015; Evendi, 2017; Silalahi, 2017).

Beberapa kegiatan farmakologi tanaman ini juga sudah dilaporkan mulai dari antioksidan, antidiare, antidiabetes, antihipertensi, antimikroba, antitumor, mengurangi kadar lemak, sampai mengurangi pembentukan plak dalam gigi. (Ismail & Wan Ahmad, 2019).

Toksistas adalah ukuran kemampuan racun untuk menyebabkan tanda-tanda toksistas. Toksistas ditentukan di laboratorium dan umumnya diterapkan pada hewan laboratorium, melalui kontak kulit, inhalasi, paparan air atau udara di lingkungan hewan laboratorium. (Rahayu dan Solihat, 2018).

Pengujian toksistas akut oral merupakan uji yang berguna dalam mengetahui toksistas sampel uji setelah pemberian oral pada rentang waktu 24 jam. Pemberian dapat berupa dosis tunggal atau berulang untuk hewan uji. Prinsip pengujian ini adalah bahwa sekelompok hewan laboratorium terpapar zat uji pada beberapa konsentrasi pada dosis yang berbeda dan efek toksik serta ketewasan diamati. (BPOM, 2014).

LD50 adalah sejumlah dosis efektif dari zat yang dapat menimbulkan kematian pada 50% populasi hewan percobaan bila terkena berbagai paparan (mg/kg BB). LD50 berbanding terbalik dengan toksistasnya, bila diperoleh LD50 yang tinggi maka, zat tersebut memiliki toksistas yang rendah (BPOM, 2014).

Penelitian terdahulu menyebutkan hewan uji mencit dimanfaatkan menjadi model laboratorium dengan persentase mendekati 40% (Nugroho, 2018). Hewan ini memiliki keunggulan dibanding hewan uji lain seperti rentang hidup yang relatif pendek, jumlah keturunan yang banyak per kelahiran, kemudahan penanganan, karakteristik reproduksi yang serupa pada mamalia lainnya, anatomi, fisiologi, dan genetika serupa dengan manusia (Fianti, 2017; Herrmann et al., 2019).

Maserasi adalah teknik penyarian senyawa aktif dalam suatu simplisia dengan

cara perendaman menggunakan pelarut yang sesuai dengan sesekali dilakukan penggojokan (Marjoni, 2016).

Pada penelitian Kuswara, (2015) menyebutkan bahwa pengujian toksistas akut infusa daun salam pada gambaran histopatologi organ hati tikus galur wistar tidak ditemukan adanya degenerasi hidropik maupun lemak, dan nekrosis. Hal tersebut berarti bahwa infusa daun salam aman untuk dikonsumsi.

Penggunaan daun salam dalam pengobatan tradisional pada dasarnya tidak bisa terlepas menurut aspek keamanan. Walaupun sudah dilaporkan mempunyai beberapa pengaruh, penggunaan yang kondusif selalu sebagai penekanan utama. Walaupun demikian, studi tentang keamanan memakai hewan uji sangat diperlukan. Penelitian ini akan melakukan pemeriksaan efek toksistas akut dari ekstrak etanol daun salam terhadap hewan uji yaitu mencit memakai metode Thompson Weil.

Metode

Penelitian ini dilakukan pada Laboratorium Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Sampel yang digunakan yaitu Daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang masih segar, muda dan bebas dari kotoran atau cemaran diambil di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Blender, ayakan mesh 40, peralatan maserasi, rotary evaporator (Bu'chi), sterling-bidwell, moisture balance, timbangan elektrik, spuit oral, tabung reaksi, pipet, water bath dan cawan porselen.

b. Bahan

Daun Salam, akuades, etanol 70%, mencit, NaCMC 0,5%, pereaksi Mayer, HCl2N, FeCl3 1%, serbuk Mg, dan HCl.

2. Pembuatan Sediaan Uji

Sediaan uji dibuat sebagai suspensi. Bahan pensuspensi yang digunakan adalah CMC 0,5%. Ekstrak disuspensikan dalam CMC 0,5% karena ekstrak tidak larut sempurna dalam air. CMC adalah senyawa non-toksik dan non-

iritasi, sehingga pembawa tampaknya tidak berpengaruh pada uji toksisitas. Pemberian sediaan uji dilakukan secara oral dengan menggunakan sonde oral.

Sampel disari dengan teknik maserasi. Sampel daun salam (*Syzygium polyanthum*) ditimbang hingga 500 gram dan dilarutkan dalam pelarut etanol 70% hingga volume 7000 mL untuk mengekstrak komponen senyawa bioaktif dari daun salam. Campuran dibiarkan selama 5 hari dalam kondisi terlindung cahaya, dikocok ± 3 kali sehari, saat hari ke-5 filtrat dipisahkan dengan ampas menggunakan penyaringan kain flanel. Ampas yang dihasilkan ditambahkan ke dalam cairan penyari 1750 mL kemudian didiamkan selama 2 hari dengan pengocokan tiga kali sehari dan penyaringan menggunakan kain flanel. Filtrat yang dihasilkan selanjutnya diuapkan pelarut yang masih ada dengan menggunakan rotary evaporator sampai ekstrak pekat dengan temperatur 40°C.

Identifikasi Kandungan Sampel

Uji Saponin

Menimbang 0,1 gram ekstrak daun salam ditambah 5 mL aquadest panas kemudian dibiarkan sampai dingin. Larutan selanjutnya digojok hingga menimbulkan busa dan dibiarkan ± 2 menit. Setelah itu ditambah larutan HCl 2 N sebanyak 2 tetes lalu dikocok sampai menimbulkan busa ± 10 menit. Pengujian dinyatakan positif senyawa saponin bila terdapat busa selama pengujian.

Uji Flavonoid

Menimbang 0,1 gram ekstrak daun salam ditambah 5 mL etanol 70% dan 0,1 gram serbuk Mg. Pengujian dinyatakan positif senyawa flavonoid bila terjadi perubahan warna larutan hmenjadi kuning sampai jingga.

Uji Tannin

Menimbang 0,1 gram ekstrak daun salam ditambah 5 mL etanol 70% lalu ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1%. Pengujian dinyatakan positif senyawa tannin bila terjadi perubahan warna larutan menjadi biru tua.

Uji Alkaloid

Menimbang 0,1 gram ekstrak daun salam ditambah dengan 5 mL etanol 70% kemudian ditambah setetes demi setetes Reagen Dragendorff. Terjadinya endapan coklat menandakan adanya indikator positif alkaloid.

Pengujian Toksisitas Akut pada Mencit

Pada pengujian ini digunakan 30 ekor mencit sehat dengan berat badan 20-22 gram, mencit dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan dalam satu kelompok terdiri dari 6 ekor mencit. Kelompok perlakuan adalah :

Kelompok P1 : diberi CMC 0,5%

Kelompok P2 : diberi 800 mg/kg dosis manusia.

Kelompok P3 : diberi 1600 mg/kg dosis manusia.

Kelompok P4 : diberi 3200 mg/kg dosis manusia.

Kelompok P5 : diberi 6400 mg/kg dosis manusia.

Hewan percobaan terlebih dahulu ditimbang, selanjutnya melakukan induksi sediaan uji per oral sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan sebelumnya. Kemudian hewan uji diamati pada waktu 24 jam dan pada jam ke-1, ke-4, ke-6, ke-12, dan ke-24 dicatat gejala klinis yang terjadi pada mencit tersebut serta kematiannya. Jika dalam pengamatan 24 jam tersebut belum terjadi kematian 50% maka pengamatan dilanjutkan ke hari berikutnya hingga memperoleh kematian hewan uji 50% serta diamati gejala klinis seperti gelisah, penurunan aktivitas gerak, dan penurunan berat badan. Sediaan uji ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) pada mencit diberikan hanya satu kali sehari, yaitu pada hari ke-1 hingga ke-4. Setelah itu, setiap hari diberi pakan standar dan dilakukan pengamatan berapa jumlah hewan uji yang mati.

Hasil dan Pembahasan

Hasil yang diperoleh dalam rendemen ekstrak dengan 500 gram zat mengandung 152 gram bahan aktif daun salam. Hasil rendemen tidak kurang dari 18,2% (Kemenkes RI, 2017). Berdasarkan hasil perhitungan rendemen yang dihasilkan sebesar 30,4%, hal itu menunjukkan

bahwa rendeman daun salam memenuhi persyaratan.

Skrining fitokimia dilakukan dengan identifikasi tabung guna mengetahui adanya senyawa saponin, flavonoid, taninn, dan alkaloid pada sampel uji.

Sediaan uji ditentukan dengan mencampurkan preparat uji disuspensikan menggunakan CMC 0,5% (kontrol negatif) dibandingkan dengan kelompok uji, dosis preparat diuji dalam 5 kelompok dosis, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit.

Hewan uji ditimbang pada saat sebelum pemberian sediaan uji dan setelah pemberian sediaan uji pada hari ke-1 sebelum pemberian sediaan uji, hari ke-2 sampai ke-4 setelah pemberian sediaan uji. Terjadinya penurunan berat badan mencit setiap hari merupakan gejala toksik yang terjadi pada mencit.

Beberapa penurunan berat badan mencit pada hari ke-1 dipengaruhi oleh keadaan fisiologis dan lingkungan. Penurunan berat badan pada hari ke-2 sampai hari ke-4 dipengaruhi oleh gejala klinis uji toksisitas pada mencit. Pada hari ke-2 di beberapa kelompok sudah terjadi kematian dan hari berikutnya kematian semakin meningkat hingga 50% kematian hewan uji.

Pengamatan hewan percobaan dilakukan selama 4 hari, dengan mengamati gejala klinis yang terjadi pada hewan uji. Pada pengamatan 24 jam diamati pada 1 jam setelah pemberian sediaan oral kemudian diamati lagi pada jam ke-4, ke-6, ke-12 dan jam ke-24 setelah itu pengamatan berlangsung pada hari ke-2, hari ke-3 dan ke-4. Gejala klinis yang diamati berupa gelisah, penurunan aktivitas gerak dan penurunan berat badan mencit.

Gejala toksik berupa gelisah tertinggi pada kelompok dosis 800 mg, penurunan aktivitas gerak tertinggi pada kelompok dosis 3200 mg, penurunan berat badan tertinggi pada kelompok dosis 3200 mg dan 6400 mg, dan kematian tertinggi pada kelompok dosis 6400 mg.

Penurunan berat badan pada mencit kemungkinan disebabkan karena stres, maka metabolisme mengalami peningkatan dan energi yang dibutuhkan juga mengalami peningkatan (Azhari et al., 2017). Energi yang

diperlukan akan dipenuhi oleh konsumsi energi cadangan tubuhnya, yang mengakibatkan penurunan berat badan pada mencit (Beulen et al., 2018).

Pengaruh berubahnya bobot hewan uji juga dipengaruhi dari faktor internal hewan uji itu sendiri. Salah satunya adalah gen induk hewan yang kemudian berpengaruh terhadap seluruh aktivitas fisik. Faktor eksternal yang mengakibatkan perubahan bobot hewan uji antara lain kondisi lingkungan hidup, sinar matahari, aktivitas, suhu, makanan dan minuman dari hewan uji (Ikalot, 2013; Evendi A, 2017).

Kematian hewan uji ditandai dengan adanya gejala-gejala klinis. Jumlah hewan uji tiap kelompok 6 ekor pada masing-masing kelompok. Pada dosis 800 mg terjadi 20% kematian dengan jumlah mencit 1 ekor, pada dosis 1600 mg dan 3200 mg terjadi 30% kematian dengan jumlah mencit 2 ekor sedangkan pada dosis 6400 mg terjadi 50% kematian dengan jumlah mencit 3 ekor.

Uji ini dilakukan dengan jumlah mencit 6 ekor pada setiap kelompok. Dengan dosis terkecil 800 mg dan kelipatan dosis yang digunakan yaitu 2.

Diketahui :

$$\text{Log } m = \text{log } D + d (f + 1)$$

$$D = 800 \text{ mg}$$

$$D = \text{Log } 2$$

$$r \text{ values} = 1,2,2,3$$

$$f = 0,50$$

$$df = 0,88976$$

$$\text{Log LD}_{50} = \text{Log } 800 + \text{Log } 2 (0,50 + 1)$$

$$= 2,903 + 0,301 (1,50)$$

$$= 3,355$$

$$m = \text{antilog } 3,355 \rightarrow 2262,03 \text{ mg/kg}$$

Berdasarkan tabel Thompson weil harga r yaitu 1,2,2,3 dengan nilai f yaitu 0,50 kemudian dianalisa kematian berdasarkan tabel weil sehingga nilai LD₅₀ didapat 2262,03 mg/kg dimana dapat dilihat dari tabel ketoksikan termasuk kategori toksik ringan.

Tabel 1. Hasil persentase rendemen ekstrak

Simplisia	Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Daun Salam	500,0	152,0	30,4%

Tabel 2. Hasil identifikasi kandungan sampel

Identifikasi	Reaksi	Hasil	Bukti	Keterangan
Saponin	HCl 2 N	Positif (+)		Terbentuk buih setelah ditetes HCl 2N buih tidak hilang
Tannin	FeCl ₃ 1%	Positif (+)		Terbentuk hasil warna biru tua
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl	Positif (+)		Terbentuk bewarna kuning
Alkaloid	Reagen Mayer	Positif (+)		Mayer terbentuk endapam merah

Tabel 3. Hasil monitoring berat badan mencit

Kelompok	BB Awal (g) ± SD	Hari ke-1 (g) ± SD	Hari ke-2 (g) ± SD	Hari ke-3 (g) ± SD	Hari ke-4 (g) ± SD
CMC 0,5%	20,50 ± 00,50	20,50 ± 00,50	20,50 ± 00,50	20,50 ± 00,50	20,50 ± 00,50
800	20,33 ± 00,47	20,16 ± 00,37	19,00 ± 00,57	15,66 ± 00,40	15,33 ± 00,48
1600	20,83 ± 00,68	20,33 ± 00,74	16,00 ± 00,74	12,33 ± 00,50	9,16 ± 00,47
3200	21,16 ± 00,68	20,33 ± 00,94	16,16 ± 00,80	11,83 ± 01,08	8,83 ± 00,47
6400	20,83 ± 00,68	20,00 ± 00,57	15,50 ± 00,48	11,66 ± 01,11	8,16 ± 00,47

Tabel 4. Hasil pengamatan gejala klinis

Kelompok	Waktu	Hewan uji 1	Hewan uji 2	Hewan uji 3	Hewan uji 4	Hewan uji 5	Hewan uji 6
800	1 JAM	aa	aa	aa	aa	aa	aa
	4 JAM	-	-	-	-	-	-
	6 JAM	-	-	-	-	-	-
	12 JAM	-	-	-	-	-	-
	HARI 1	A	A	A	A	A	A C
	HARI 2	A C	A C	B C	B C	B C	A C
	HARI 3	A	A	B C	B C	B	D
	HARI 4	B	B C	B	B	B C	D
1600	1 JAM	aa	aa	aa	aa	aa	aa
	4 JAM	-	-	-	-	-	-
	6 JAM	-	-	-	-	-	-
	12 JAM	-	-	-	-	-	-
	HARI 1	B	B C	A	B	B C	B
	HARI 2	B C	B C	A C	B C	D	B C
	HARI 3	B C	D	A C	B C	D	B C
	HARI 4	B C	D	B	B	D	B
3200	1 JAM	aa	aa	aa	aa	aa	aa
	4 JAM	-	-	-	-	-	-
	6 JAM	-	-	-	-	-	-
	12 JAM	-	-	-	-	-	-
	HARI 1	B	B C	B	B C	B	B C
	HARI 2	B C	B C	B C	D	B C	B C
	HARI 3	B C	D	B C	D	B C	B C
	HARI 4	B	D	B C	D	B	B
6400	1 JAM	aa	aa	aa	aa	aa	aa
	4 JAM	-	-	-	-	-	-
	6 JAM	-	-	-	-	-	-
	12 JAM	-	-	-	-	-	-
	HARI 1	B	A	A C	B C	A	A C
	HARI 2	B C	B C	B C	D	B C	B C
	HARI 3	B C	B C	D	D	B	B C
	HARI 4	B C	B	D	D	B C	D

^{aa} tidur; ^A gelisah; ^B penurunan aktivitas gerak; ^C penurunan berat badan; ^D kematian

Daftar Pustaka

- Azhari, B., S. Luliana dan Robiyanto. (2017). Uji Aktivitas Antihiperkolesterolemia Ekstrak Air Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn.) Pada Pemodelan Tikus Jantan Galur Wistar Hiperkolesterolemia. *J. Traditional Medicine* 22 (1): 57-62.
- Beulen Y., M. A. M. González, O. van de Rest, J. S. Salvador, J. V. Sorlí, E. G. Gracia, M. Fiol, R. Estruch, J. M. S. Lozano, H. Schröder, A. A. Gómez, L. Majem, X. Pintó, E. Ros, N. B. Tomas, J. I. González, M. Fitó, J. A. Martínez and A. Gea. (2018). Quality of Dietary Fat Intake and Body Weight and Obesity in a Mediterranean Population: Secondary Analyses within the PREDIMED Trial. *Article Journal Nutrients* 10: 1-13.
- BPOM. (2014). Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Nomor 7 Tahun 2014 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara In Vivo.
- Elfahmi, Woerdenbag, H. J., & Kayser, O. (2014). Jamu: Indonesian traditional herbal medicine towards rational phytopharmacological use. *Journal of Herbal Medicine*, 4(2), 51–73.
- Evendi A. (2017). Uji fitokimia dan anti bakteri ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli* secara In Vitro. *Mahakam Med Lab Technol J* ;2(1).Hal.1-9
- Fianti LL. (2017). Efektivitas perasan daun afrika (*Vernonia amygdalina* Del) terhadap penurunan kadar glukosa darah mencit (*Mus musculus*). [Disertasi]. Bandung. Universitas Pasundan.
- Herbie, T. (2015). *Kitab Tanaman Berkhasiat Obat: 226 Tumbuhan Obat Untuk Penyembuhan Penyakit dan Kebugaran Tubuh*. Yogyakarta: Octopus Publishing House.
- Herrmann K, Pistollato F, Stephens ML. (2019). Beyond the 3Rs: expanding the use of human-relevant replacement methods in biomedical research. *Altex* 36(3): 343-352.
- Ikalot. (2013) Pertumbuhan dan Perkembangan. *Jurnal Pertumbuhan dan Perkembangan* ;7:1-6.
- Ismail, A., & Wan Ahmad, W. A. N. (2019). *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp: A potential phytomedicine. *Pharmacognosy Journal*, 11(2), 429–438.
- Kementerian Kesehatan RI. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Kuswara, R. (2015). Uji Toksisitas Akut Infusa Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Galur Wistar. Universitas Tanjungpura.
- Marjoni, R. (2016). *Dasar – Dasar Fitokimia*, Trans Info Media, Jakarta
- Rahayu, M., & Solihat, M. F. (2018). *Toksikologi Klinik*. PPSDM Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Silalahi, M. (2017). *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. (Botani, Metabolit Sekunder dan Pemanfaatan). *Jurnal Dinamika Pendidikan*, 10(1), 187–202.