

Uji toksisitas akut ekstrak etanol daun klausena

(*Clausena anisata* Hook.f.)

Hanifah Yusuf

Abstrak. Daun klausena (*Clausena anisata* Hook.f) termasuk familia Rutaceae, telah digunakan masyarakat Sumatera Barat dan Jawa untuk menghilangkan nyeri, baik nyeri kepala, nyeri gigi, rematik dan demam. Secara klinik penggunaan obat tradisional tidak diakui, bila belum terbukti secara ilmiah tentang khasiat maupun keamanannya. Karena belum adanya bukti tentang keamanannya, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui dosis letalis 50 (LD 50) ekstrak etanol daun klausena pada tikus putih. Penelitian eksperimental laboratorik ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap ($n = 5$) dengan hewan percobaan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dan betina sehat, galur wistar, umur ± 2 bulan, dan berat badan ± 200 g. Enam kelompok tikus putih diberi ekstrak etanol daun klausena secara oral, dengan 5 tingkatan dosis (0,55 mg, 1,1 mg, 2,2 mg, 4,4 mg dan 8,8 mg/ 200 g BB). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat kematian tikus putih 3 ekor pada dosis 4,4 mg/200 g BB dan 5 ekor pada dosis 8,8 mg/200 g BB ekstrak etanol daun klausena. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun klausena tidak toksik dengan nilai LD 50 = 17036,85 mg/ kg BB secara oral. Pada pemeriksaan mikroskopik terhadap organ utama kelompok hewan yang mendapatkan dosis tertinggi (8,8 mg/200 g BB) terlihat adanya perubahan berupa degenerasi sel, nekrosis dan pendarahan. (JKS 2008; 1:1-6)

Kata kunci: Toksisitas akut, degenerasi, nekrosis

Abstract. The leaves of klausena plant (*Clausena anisata* Hook.f), belongs to Rutaceae family has been used by the people in West Sumatera and Java to treat the pain, like headache, toothache, rheumatism and fever. The used of this medicinal plant is not recognized clinically, because it has not been tested scientifically, primary about it's pharmacological activity and safety. Because their safety has not been proven, therefore this research has been done for knowing the lethal dose 50 (LD₅₀) of ethanolic extract from the leaves of klausena in rats. The experimental laboratoric research has been done, using Completely Randomized Design ($n = 5$) and as experimental animal used male and female rats (*Rattus norvegicus*), wistar strain, fine, approximately 2 months age and weighed 200 g. Six groups of rats has been treated orally with the ethanolic extract from the leaves of klausena (*Clausena anisata* Hook.f) in five level doses (0,55 mg, 1,1 mg, 2,2 mg, 4,4 mg dan 8,8 mg/ 200 g Body Weight of rat). The result showed 3 rats at dose 4,4 mg/200 g and 5 rats at doses 8,8 mg/200 g Body Weight of rat were died. The obtained indicated the ethanolic extract from the leaves of klausena is not toxic in rats and the value of lethal dose is 17036,85 mg / kg Body Weight, orally. Microscopically, at the high dose on experimental animal primary organ has been found some changes, like degeneration; necroses and bleeding of cells. (JKS 2008; 1:1-6)

Key words: Acute toxicity, degeneration, necroses

Pendahuluan

Iklan berbagai produk obat tradisional semakin intensif ditayangkan di berbagai media dengan asumsi bahwa obat tradisional aman dan bebas efek samping merupakan informasi yang paling sering ditonjolkan.¹ Salah satu obat tradisional yang masih digunakan sebagai obat penghilang nyeri (*analgetik*), anti tumor dan anti diabetik adalah tanaman klausena (*Clausena anisata* Hook.f), dengan nama daerah sicerek (Sumatera Barat), ki mantu (Sunda), ki bajetah (Jawa), temung

(Aceh). Di Afrika Selatan daun klausena juga digunakan untuk mengobati gangguan pada saluran pernafasan dan luka akibat gigitan serangga.²

Tanaman ini mempunyai nilai ekonomis yang tinggi karena dapat digunakan sebagai obat, sedangkan minyak atsiri yang dikandungnya digunakan dalam campuran obat dan kosmetika. Kandungan senyawa kimia yang terdapat pada daun klausena selain minyak atsiri juga terdapat flavonoid, alkaloid, saponin dan tannin.³ Minyak atsiri klausena mengandung anethol 90-95%, methyl khavicol 5,92%, anisaldehyd 2%, methoxycinnamaldehyd 2,4% dan methoxycinnamylalkohol 0,58%.⁴

Hanifah Yusuf adalah Dosen Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala

Hasil ekstraksi daun klausena dengan etanol 80%, ternyata minyak atsiri klausena mengandung anethol 85,06%, methyl khavicol 5,42%, ethyl pentadecanoat 5.88%, penta-decadien 1-01 3,64% dan lain-lain.⁵ Sedangkan pada cabang tanaman klausena terdapat senyawa coumarin, clausine dan clausamine, dikatakan memiliki khasiat sebagai anti tumor.⁶ Uji khasiat infus dan ekstrak etanol daun klausena telah terbukti dapat menghilangkan nyeri pada tikus putih dengati metode "Rat Tail Flick Test"⁵, sedangkan isolasi zat aktif yang terdapat di dalam ekstrak etanol daun klausena yang berkhasiat sebagai penghilang nyeri (*analgetik*) sudah dilakukan.⁵ Penggunaan ekstrak metanol dari akar tanaman klausena telah dilaporkan berkhasiat sebagai anti-diabetik. Oleh karena belum ada laporan tentang keamanan penggunaan tanaman klausena sebagai obat, maka penting dilakukan penelitian "Uji toksisitas akut ekstrak etanol daun klausena (*Clausena anisala* Hook.f) pada tikus putih", sehingga dapat diperkirakan gambaran toksisitas ekstrak etanol daun klausena pada manusia.

Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan derajat toksisitas ekstrak daun klausena pada tikus putih, yang ditunjukkan dengan dosis letalis 50 (LD₅₀, Lethalis Dose 50), gambaran gejala-gejala, intensitas dan spektrum toksisitas. Disamping itu juga dapat dilihat adanya perubahan berat badan dan histologi organ utama tikus putih akibat pemberian ekstrak etanol daun klausena dalam berbagai tingkatan dosis.

Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini untuk memberikan informasi tentang keamanan tanaman obat tradisional klausena, dalam upaya perlindungan kesehatan kepada masyarakat. Disamping itu kepada tenaga kesehatan kiranya dapat memberikan gambaran bahwa tidak semua obat tradisional yang digunakan aman bagi kesehatan.

Metode penelitian

Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus novergicus*), galur Wistar, jantan dan betina, umur $\pm$ 2 bulan dan berat badan $\pm$ 200 g. Tikus putih jantan dan betina dipelihara secara terpisah di dalam kandang yang ditempatkan di dalam ruangan yang terjaga kebersihannya, dengan siklus cahaya 12 jam terang dan 12 jam gelap. Makanan hewan percobaan berupa pellet, sedangkan minumannya adalah aqua yang diberikan secara ad libitum. Hewan percobaan dibagi menjadi 6 kelompok secara acak dan tiap kelompok terdiri dari 5 ekor. Sebelum pemberian obat uji, hewan percobaan dipuaskan selama 12-16 jam tetapi minum tetap diberikan. Selanjutnya makanan kembali diberikan 6 jam setelah pemberian obat uji.⁷

Bahan-bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: Ekstrak etanol daun klausena (obat uji), Aqua destillata, Etanol 96% p.a., Formadehid p.a., Haematoxylin, Asam Pikrat, Eosin, Methylen Blue, Xylol, Parafin Solidurn, Tikus putih (jantan dan betina).

Alat-alat

Alat-alat yang digunakan antara lain: alat-alat gelas, alat-alat bedah, microtome, sonde oral, spuit injeksi 1 dan 3 ml, timbangan hewan, timbangan elektrik, mikroskop elektrik, dan loupe.

Pembuatan ekstrak etanol daun klausena (obat uji)

Ekstrak etanol daun klausena dibuat secara maserasi dengan menggunakan etanol 80%. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan vacum rotary evaporator, kemudian ditempatkan di dalam botol berwarna yang tertutup rapat dan disimpan di dalam lemari pendingin. Untuk uji toksisitas akut, obat uji dibuat dalam bentuk suspensi dari ekstrak etanol daun klausena dengan dosis 0,55 mg, 1,1 mg, 2,2 mg, 4,4 mg dan 8,8 mg/200 g BB. Masing-masing obat uji diberikan secara oral sebanyak 1 ml/200 g BB dengan menggunakan oral sonde dari logam kepada

setiap hewan percobaan dari setiap kelompok.

Pelaksanaan uji toksisitas akut

Uji toksisitas akut ekstrak etanol daun klausena dilakukan dengan menggunakan metode.⁸ Sebelum pengujian, hewan percobaan diaklimatisasi selama 7 hari, selama aklimatisasi dan setelah pemberian obat uji, berat badan hewan percobaan ditimbang 2 kali dalam seminggu. Setelah pemberian obat uji, hewan percobaan dikembalikan ke dalam kandangnya dan pengamatan dilakukan secara seksama selama 6 jam. Jumlah kematian hewan percobaan dihitung selama 24 jam dan pengamatan selanjutnya dilakukan 2 kali sehari selama 14 hari. Jumlah kematian hewan percobaan dicocokkan dengan tabel Well, C.S. Kemudian ditentukan dosis letalis (LD_{50}) ekstrak etanol daun klausena pada tikus putih.⁹ Selama percobaan, dilakukan observasi terhadap gejala-gejala toksisitas yaitu berupa perubahan warna kulit, bulu, mata, pernafasan, lakrimasi, hipersalivasi, hiporeaktif dan perilaku lainnya. Selanjutnya terhadap hewan yang mati dilakukan autopsi dengan melakukan pemeriksaan histologis terhadap paru-paru, jantung, hati, ginjal, saluran cerna, dan otak. Sedangkan hewan yang masih bertahan hidup dipelihara terus sampai hari ke 14. Setelah itu percobaan diakhiri dan semua hewan percobaan didekapitasi dan dilakukan pemeriksaan histologis terhadap organ utama dengan metode standar.

Pembuatan sediaan histologis organ utama hewan percobaan

Sediaan histologis organ utama hewan percobaan dibuat dengan metode parafin, setelah tikus didekapitasi, segera dikeluarkan organ-organ yang akan diobservasi. Organ-organ (hati, jantung, paru, saluran cerna, otak dan ginjal) setelah dicuci dengan larutan fisiologis, lalu difiksasi dalam larutan Bouins selama 24 jam. Kemudian dilakukan dehidrasi dalam alkohol seri, kliring dalam xylol, infiltrasi dan embedding dalam parafin. Organ dipotong dengan menggunakan mikrotom (microtome) dengan ketebalan 5 mikron. Masing-masing sediaan dibuat 5 sayatan dengan interval 10

sayatan. Sedangkan pewarnaan dilakukan dengan menggunakan hematoksilin-eosin.¹⁰

Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap perubahan histologis organ-organ dimaksud, dengan menggunakan mikroskop elektrik pada perbesaran 10 x 40. Agar bidang pandang stabil pada pengamatan, dibuat batasan dari kertas yang ditempatkan pada lensa okuler. Sebagai parameter, adanya perubahan histologis pada organ-organ utama hewan percobaan, dilihat kemungkinan adanya degenerasi, nekrosis dan pendarahan.

Analisa data

Data jumlah hewan yang mati pada masing-masing kelompok digunakan untuk menghitung dosis letalis (LD_{50}) dengan menggunakan metode⁸, yang selanjutnya digunakan untuk mengevaluasi intensitas (potensi) toksisitas akut menurut kriteria.¹¹ Untuk mengetahui pengaruh berbagai tingkatan dosis ekstrak etanol daun klausena terhadap organ utama hewan percobaan dilakukan pengamatan secara deskriptif dari sediaan histologis. Dengan demikian dapat diketahui spesifitas spektrum efek toksis pada tikus putih yang disebabkan oleh ekstrak etanol daun klausena.

Implikasi etik eksperimentasi hewan percobaan

Pengelolaan hewan percobaan mengikuti Animal's Ethic yang sesuai dengan Declaration Of Helsinki.¹²

Hasil ekstraksi daun klausena

Hasil ekstraksi 400 g daun klausena (*Clausena anisata* Hook. f) segar dengan etanol 80%, diperoleh ekstrak etanol daun klausena rata-rata 10,6 g.

Nilai dosis letalis (DL 50, LD 50)

Uji toksisitas akut ekstrak etanol daun klausena dilakukan selama 14 hari. Jumlah kematian hewan percobaan telah memenuhi kriteria yang tercantum dalam metode Weil, C.S, seperti yang ditunjukkan dalam tabel 1. Dengan menggunakan metode tersebut, maka diperoleh LD 50 ekstrak etanol daun klausena pada tikus putih 3407,37 mg/200 g BB atau

17036,85 mg/kg BB, secara oral. Untuk menentukan tingkat toksisitas akut suatu bahan, telah membuat klasifikasi bahan dengan berbagai tingkat toksisitas.¹¹ Adapun batas minimum keamanan bahan-bahan yang digunakan adalah pada bahan-bahan dengan

nilai LD 50 >15.000 mg/kg BB secara oral pada tikus. Dengan demikian LD 50 ekstrak etanol daun klausena sebesar 17.036,85 mg/kg BB secara oral lebih besar dari 15.000 mg/kg BB, sehingga dapat dikatakan praktis tidak beracun (*Practically Non Toxic*).

Tabel 1. Kematian tikus putih setelah pemberian ekstrak etanol daun klausena

Kelompok	Hewan Percobaan (Tikus Putih)	Dosis Tunggal Mg EEDK/200 g BB	Jumlah Kematian Tikus Putih
I	5 ekor	1 ml GA 2%	0
II	5 ekor	0,55	0
III	5 ekor	1,1	0
IV	5 ekor	2,2	0
V	5 ekor	4,4	3
VI	5 ekor	8,8	5

Gejala-gejala toksisitas

Pada pengamatan setelah pemberian ekstrak etanol daun klausena secara oral dengan dosis 0,55 – 2,2 mg /200 g BB, ditemukan gejala-gejala berupa keringat banyak, takhikardia dan pernafasan cepat. Gejala-gejala yang terlihat pd dosis ini hilang setelah 2-4 jam kemudian. Sedangkan pada dosis 4,4 /200 g BB didapat kematian 3 ekor (67,7%) dan 5 ekor (100%) pada dosis 8,8 mg/200 g BB. Efek toksik pada dosis ini sudah mulai terjadi pada menit ke 30 - 180 setelah pemberian obat uji, yaitu berupa penurunan aktifitas motorik, berkeringat banyak, pernafasan sangat cepat, takhikardia, konvulsi berkali-kali, koma dan mati.

Kematian pada dosis 4,4 mg/200 g BB terjadi kurang lebih 3 jam setelah pemberian obat uji. Hal ini mungkin disebabkan adanya perbedaan sensitifitas individual, mengingat sampai dosis tertinggi terlihat adanya hubungan dosis dengan respons. Berdasarkan pengamatan pada hewan uji, efek toksisitas yang ditimbulkan dapat digolongkan sebagai efek eksitasi terhadap sistem saraf pusat (tremor, konvulsi) serta efek terhadap aktivitas motorik (gerakan lemah dan lambat).

Intensitas dan spektrum efek toksis

Hasil pemeriksaan mikroskopis (histologis) terhadap organ-organ hewan percobaan (hati, ginjal, saluran cerna, paru-paru, jantung, dan otak), pada kelompok yang mendapatkan dosis 0,55-2,2 mg/200 g BB secara deskriptif dapat dikatakan tidak ditemukan adanya perubahan yang berarti. Perubahan pada organ hewan percobaan, hanya terjadi pada dosis tertinggi yaitu pada dosis 8,8 mg/200 g BB yaitu berupa degenerasi, nekrosis dan pendarahan sel.

Perubahan berat badan

Penimbangan berat badan hewan percobaan dilakukan 2 kali dalam seminggu, hasilnya dapat dilihat pada tabel 2. Tabel ini menunjukkan bahwa perubahan berat badan pada tikus putih yang mendapatkan perlakuan tidak begitu berbeda, bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perubahan berat badan yang berarti setelah pemberian ekstrak etanol daun klausena dengan berbagai tingkatan dosis secara tunggal. Dengan demikian terbukti bahwa ekstrak etanol daun klausena dengan dosis 0,55 – 8,8 mg/200 g BB tidak menyebabkan perubahan berat badan yang nyata ($p > 0,05$).

Tabel 2. Perubahan berat badan tikus putih pada uji toksisitas EEDK

Kelompok	Berat Badan Sebelum Pertakuan (g)	Berat Badan Setelah Perlakuan (g)
P-1	105,33 ± 6,51	103,33 ± 5,52
P-2	108,66 ± 6,72	106,66 ± 6,23
P-3	102,66 ± 6,60	102,66 ± 6,81
P-4	153,99 ± 26,70	155,99 ± 24,42
P-5	192,66 ± 22,43	189,99 ± 24
P-6	170,66 ± 13,09	172 ± 12,94

Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil penelitian

Secara umum diketahui bahwa pemberian satu dosis obat pada sekelompok individu akan menunjukkan variasi respon, baik dalam bentuk efek terapi maupun efek toksik. Banyak hal yang dapat mempengaruhi respon individu terhadap obat, antara lain umur, jenis kelamin, spesies, keadaan patofisiologis, dan lingkungan. Meskipun percobaan yang dilakukan telah dikondisikan dalam keadaan konstan, tetapi selalu saja menghasilkan perbedaan, hal ini dikarenakan adanya variasi biologik antar individu hewan percobaan.

Kesimpulan dan saran

Kesimpulan

Berdasarkan hal-hal yang diuraikan diatas, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak etanol daun klausena (*Clausena anisata* Hook.f) tidak toksik, dengan nilai $LD_{50} = 17036,85 \text{ mg/kg BB} > 15.000 \text{ mg/kg BB}$.
2. Ekstrak etanol daun klausena tidak memiliki spektrum efek toksik yang berarti karena masih berada dibawah batas angka tidak toksik (Practically Non Toxic $> 15.000 \text{ g/kg BB}$).¹¹
3. Gejala-gejala toksik terjadi pada dosis 8,8 mg/200 g BB berupa keringat banyak, takhikardia, pernafasan cepat, konvulsi, koma dan kemudian mati.
4. Pemberian ekstrak etanol daun klausena pada tikus putih tidak menunjukkan perubahan berat badan yang nyata.

5. Secara mikroskopis terjadi perubahan-perubahan histologis organ tikus putih pada dosis ekstrak etanol daun klausena 8,8 mg/200 g BB, berupa degenerasi sel, nekrosis dan pendarahan.

Saran

1. Diperlukan informasi yang akurat tentang khasiat dan keamanan obat tradisional yang sering digunakan masyarakat. Hal ini dimaksudkan sebagai upaya perlindungan kepada masyarakat.
2. Aktivitas penelitian obat tradisional yang berpotensi dalam mengobati penyakit yang paling besar angka morbiditas dan mortalitasnya, sebaiknya diprioritaskan mengingat penggunaan obat tradisional semakin meningkat di dalam masyarakat.

Daftar pustaka

1. Hargono, Dj. Tumbuhan Obat dan Pelayanan Kesehatan dalam Antropologi Kesehatan Indonesia. Pengobatan Tradisional. Editor Azwar Agoes dan T.Yacob. Jilid I Penerbit Buku Kedokteran EGC, Indonesia. 1992. 13-34.
2. Lewis, W.H. and Lewis, P.F.E. Medical Botany In Plants Affecting Man's Health. 1st ed. A. Wiley - Interscience Publication. Jhon Wileyson, New York, London. 1977. 237-369
3. Burkill, L.H. A Dictionary Of The Economic Products Of The Malay Peninsula. Vol I. Governments Of The Straits Settlement And Federated Malay States By The Crown Agents For The Colonies. Millbank, London. 1935.577-578

4. Westphal, E. dan Jansen, P.C.M. Plant Resources Of South-East Asia. Bogor, Indonesia. 1993. 88-90
5. Yusuf, H. Efek Analgesia Ekstrak Daun Klausena (*Clausena anisata* Hook.f.) Pada Tikus Putih Dengan Metode Rat Tail Flick Test. Thesis Program Pascasarjana Universitas Sumatera Utara, Medan. 2001.
6. Ito, C. et al. New Carbazole Alkaloids From Clausena Anisata Hook.f. With Antitumour Promoting Activity. Journal Of Natural Product. 1999. Vol 63 (1): 125-128
7. Santos, A.C; Santos, S.P; Solevilla, C.R. Phytochemical, Microbiological And Pharmacological Screening, Of Medicinal Plants. GMS Publishing Corporation. Manila, Philippines. 1978. 37-55
8. Weil, C.S. Tables For Convenient Calculation Of Median Effective Dose (LD 50 and ED 50) and Instruction In Use. Biometrics 8. 1952. 249-263.
9. Ghosh, M.N. and Schild, H.O. Fundamentals Of Experimental Pharmacology. Scientific Book Agency, Calcutta. 1971. 84-88
10. Gridley, M.F. Manual Of Histologic And Special Staining Technics. 2nd ed. The Blakiston Division, Mc Graw- Hill Book Company, Inc, New York, Toronto, London. 1960.
11. Gleason, M.N. Clinical Toxicology On Commercial Products. The William & Wilkins Company. Baltimore. 1969. 3-5.