

Uji Toksisitas Subkronik Kombinasi Ekstrak Daun *Uncaria gambir* dan *Caesalpinia sappan*

Sub-Chronic Toxicity Test of *Uncaria gambir* and *Caesalpinia Sappan* Combined Extract

Sri Ningsih*¹, Kurnia Agustini¹, Nizar¹, Rini Damayanti²

¹Pusat Teknologi Farmasi dan Medika – Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi
Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang Selatan, Banten, Indonesia

²Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor, Jawa Barat, Indonesia.

*E-mail : sri.ningsih@bppt.go.id

Diterima: 7 November 2017

Direvisi: 12 Februari 2017

Disetujui: 28 Februari 2017

Abstrak

Prevalensi hiperuresemia cenderung meningkat di masyarakat. Formula herbal (FH) mengandung ekstrak *Uncaria gambir* (gambir) dan *Caesalpinia sappan* (secang) terbukti menurunkan asam urat secara *in vivo*. Penelitian ini bertujuan untuk menguji keamanan subkronis FH pada hewan tikus galur *Sprague Dawley* jantan dan betina. Tikus dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok, yaitu DOSIS-1 (75 mg/kg BB), DOSIS-2 (300 mg/kg BB), DOSIS-3 (1200 mg/kg BB) dan kontrol pembawa. FH diberikan secara peroral selama 7 minggu. Hasil menunjukkan bahwa pemberian FH pada ketiga dosis uji tidak memengaruhi biokimia darah dan hematologi darah secara bermakna dibandingkan kontrol ($p > 0,05$), kecuali pada hewan betina DOSIS-2 menunjukkan kadar NEUT lebih rendah dan berbeda bermakna dibanding kontrol ($p < 0,05$). Gambaran histopatologi organ ginjal, hati, jantung, usus halus, dan lambung menunjukkan tidak ditemukan ada lesi yang berbeda bermakna dibanding kontrol ($p > 0,05$), khususnya pada kelompok DOSIS-1. Selanjutnya, DOSIS-1 tidak memengaruhi konsumsi pakan dan berat badan hewan coba. Dapat disimpulkan bahwa pemberian FH dosis 75 mg/kg BB selama 7 minggu tidak menyebabkan gangguan biokimia darah, hematologi darah dan gambaran histopatologi ginjal, hati, jantung, usus halus, dan lambung.

Kata Kunci: Biokimia darah; Histopatologi; Uji toksisitas subkronik; *Uncaria gambir*; *Caesalpinia sappan*

Abstract

Hiperuresemia prevalence tends to increase in society. A combined extract of Uncaria gambir (gambir) and Caesalpinia sappan (secang), had been proven to reduce blood uric acid level in vivo. This study aimed to evaluate the subchronic toxicity of this combination in male and female Sprague Dawley rat strain. Animals were randomly grouped into four groups, namely, DOSE-1 (75 mg/kg bw), DOSE-2 (300 mg/kg bw), DOSE-3 (1200 mg/kg bw) and control group gavaged with carrier. The tested sample was given for 7 weeks orally. The result of blood biochemical parameters were not different significantly compared to control ($p > 0.05$), as well as the results of hematology analysis. However, the NEUT level of female of DOSIS-2 showed lower and significantly different compared to control ($p < 0.05$). Histopathological evaluation of liver, kidney, heart, small intestine, and stomach organs illustrated that no lesions found in animals especially in DOSE-1 compared to control significantly ($p > 0,05$). Furthermore, this dose did not influence feed intake and body weight of animals in each sex. From this study, it could be concluded that the combination administrated at the dose of 75 mg/kg bw for 7 consecutive weeks did not affect blood biochemistry and hematology and also organ histopathology of kidney, liver, heart, small intestine, and stomach.

Keywords: Blood biochemistry; Histopathology; Subchronic toxicity test; *Uncaria gambir*; *Caesalpinia sappan*

PENDAHULUAN

Indonesia adalah salah satu negara dengan kekayaan sumber daya alam yang melimpah. Upaya pencarian bahan obat yang berasal dari alam merupakan langkah strategis dalam rangka mengoptimalkan keunggulan komparatif yang ada, salah satunya untuk mengatasi keluhan kondisi hiperuresemia. Hiperuresemia merupakan salah satu kelainan metabolisme yang ditandai dengan kadar asam urat tinggi. Prevalensi penderita hiperurisemia cenderung meningkat sepanjang tahun sejalan dengan tingkat kemajuan status ekonomi suatu masyarakat.¹ Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa kombinasi ekstrak gambir (*Uncaria gambir*) dan secang (*Caesalpinia sappan*), yang selanjutnya akan disebut dengan formula herbal (FH), mampu menurunkan kadar asam urat darah tikus hiperuresemia yang diinduksi menggunakan kalium oksonat. Pemberian FH pada dosis 75, 150 dan 300 mg/kg BB mampu menurunkan kadar asam urat sekitar 35-45% relatif terhadap kelompok kontrol sakit.²

Caesalpinia sappan L. atau dikenal dengan secang termasuk dalam famili Leguminose yang merupakan salah satu jenis tanaman yang banyak digunakan secara tradisional sebagai bahan makanan dan minuman serta dikenal luas memiliki berbagai aktivitas biologi. Studi ilmiah membuktikan bahwa *Sappan wood* memiliki aktivitas dalam mengatasi tuberkulosis, diare, disentri, infeksi kulit dan anemia.³ *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb, atau yang dikenal dengan gambir, termasuk ke dalam suku Rubiaceae yang merupakan tanaman spesifik lokasi yang banyak ditemukan khususnya di pulau Sumatera, Indonesia.⁴ Gambir mengandung senyawa polifenol khususnya flavonoid (+) katekin sekitar 40-80% berat dalam sediaan ekstrak air kering.⁵

Berdasarkan ketentuan BPOM, dalam pengembangan sediaan obat atau obat

tradisional, selain memiliki bukti khasiat, dipersyaratkan juga pengujian toksisitas pada hewan percobaan guna menjamin keamanan saat penggunaan pada manusia, baik pengujian secara akut maupun jangka panjang (subkronis). Pengujian toksisitas pada hewan berguna untuk melihat adanya reaksi biokimia, fisiologik dan patologik yang mungkin akan muncul sebelum penggunaan pada manusia.⁶

Penelitian toksisitas terhadap ekstrak secang dan gambir secara tunggal telah dilakukan sebelumnya. Secang dalam bentuk sediaan infus yang diberikan baik dosis tunggal dan jangka panjang 30 hari tidak menyebabkan mortalitas dan gangguan efek toksik hewan coba.³ Nalla MK melaporkan bahwa pemberian ekstrak kloroform secang dosis tunggal hingga dosis 2000 mg/kg BB tidak menyebabkan kematian dan reaksi toksik yang nyata.⁷ Ekstrak etanol secang termasuk dalam kategori aman pada uji toksisitas akut.⁸ Ekstrak etanol secang juga terbukti mampu melindungi hati akibat senyawa radikal melalui aktivitas antioksidan.⁹

Uji kemanan ekstrak gambir juga secara *in vitro* pada sel Vero¹⁰ sel intestinal IEC-6 dan uji mutagenik menunjukkan bahwa ekstrak ini aman.^{11,12} Sementara itu, uji pada hewan coba hingga dosis 4 g/kg BB tidak menyebabkan lesi organ hati yang bermakna.¹³

Pengujian keamanan dari kombinasi kedua ekstrak tersebut belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan dengan tujuan melakukan pembuktian keamanan jangka panjang (subkronis) FH pada hewan coba secara *in vivo*. Diharapkan hasil penelitian dapat mengungkap tingkat keamanan dari FH dan dijadikan dasar pada pengujian keamanan berikutnya.

METODE

Pelaksanaan penelitian telah mendapat persetujuan Komisi Etik FKUI dengan nomor 712/UN2.F1/ETIK/2015 tertanggal 25 Agustus 2015. Pengujian toksisitas subkronis dilakukan mengacu pada ketentuan BPOM.⁶

Alat penelitian meliputi kandang individual hewan tikus (Rital®), timbangan hewan (Kern®), spektrofotometer UV-Vis (Thermo®), mikrosentrifus (mikro22 Hettich zentrifuge®), dan mikropipet (Ependrof), serta perlengkapan berupa tabung plastik sekali pakai 1,5 mL (Axigen). Bahan uji formula herbal (FH) berupa kombinasi ekstrak gambir dan secang. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih galur SD jantan dan betina yang dibeli dari BPOM. Usia hewan coba saat pengujian 6-8 minggu dengan berat badan 90-125 g. Bahan kimia yang digunakan meliputi Heparin (Inviclot®), CMC (*foodgrade*), NaH₂PO₄.H₂O (Merck), K₂HPO₄ (Merck), formaldehid (Merck), reagen kit untuk analisis biokimia darah ASAT, ALAT, Gama-GT, Urea, Kreatinin, Bilirubin total (Diasys®), dan vacutainer EDTA 3 mL (Vaculab®). Analisis hematologi darah dilakukan di Laboratorium Kesehatan Daerah Tangerang Selatan. Analisis histopatologi organ dilakukan di Laboratorium Patologi Balai Besar Penelitian Veteriner mengacu pada protokol uji yang ada.

Perlakuan hewan coba

Pelaksanaan pengujian berpedoman pada ketentuan BPOM.⁶ Hewan coba diaklimatisasi pada kondisi percobaan (siklus cahaya dibuat gelap dan terang 12 jam, suhu 23±3°C, kelembapan ruangan 50%-70%) selama sekitar 7 hari kemudian dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok terdiri dari 8 ekor jantan dan 8 ekor betina per kelompok, yaitu DOSIS-1 (75 mg/kg bb), DOSIS-2 (300 mg/kg bb),

DOSIS-3 (1200 mg/kg bb) dan kontrol tanpa perlakuan. Hewan ditempatkan dalam kandang individual yang terbuat dari polikarbonat dengan jumlah tikus 4 ekor setiap kandang yang dipisahkan antara tikus betina dan tikus jantan. Tikus diberi pakan standar dan minum dalam jumlah *ad libitum*. FH disuspensikan dalam pembawa larutan CMC 0,5% secara aseptik sesuai masing-masing dosis dengan volume pemberian sebesar 1 mL/100 g bb. FH diberikan menggunakan sonde lambung setiap hari pada jam 08.00-10.00 WIB, kecuali kelompok kontrol diberi pembawa.

Penimbangan berat badan dilakukan sekali seminggu selama pengujian. Jika terdapat hewan coba yang mati, segera dilakukan otopsi dan diamati adanya kelainan organ secara makroskopis. Penimbangan pakan dilakukan pada setiap kandang setiap minggu sekali. Nilai rata-rata konsumsi pakan per hewan coba disajikan dengan membagi konsumsi pakan per kandang dibagi dengan jumlah hewan coba per kandang.

Setelah 7 minggu pemberian FH, dilakukan analisis biokimia darah. Hewan coba dipuasakan selama *overnight* 16-18 jam tetapi tetap diberi air minum, kemudian dilakukan pengambilan darah sekitar 1-1,5 mL melalui sinus orbitalis dan ditampung dalam tabung ependrof yang diberi heparin 10 uL dan digoyang perlahan-lahan. Plasma darah dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm suhu 4°C selama 5 menit. Plasma dipisahkan dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C untuk proses selanjutnya. Untuk analisis kadar urea, tidak digunakan antikoagulan heparin.¹⁴ Untuk analisis hematologi lengkap, cara pengambilan darah sama seperti di atas namun darah ditampung dalam tabung Vaculab®.¹⁵ Selanjutnya, seluruh hewan coba dikorbankan dengan cara dislokasi leher. Organ-organ hewan berupa hati, ginjal, usus halus, lambung dan

jantung diambil, dibersihkan darahnya dengan menempelkan pada kertas *tissue* dan difiksasi dalam larutan BNF 10% (*buffer neutral formalin*). Penyiapan preparat histopatologi organ dilakukan menggunakan metode standar.¹⁶

Analisis parameter uji

Analisis parameter uji yang dilakukan sebagai berikut: analisis biokimia darah untuk parameter hati (kadar ASAT dan ALAT, gama GT, dan bilirubin total) dan parameter kesehatan ginjal (kadar urea dan kreatinin) menggunakan reagen diagnostik Diasys® secara spektrofotometri dengan mengikuti protokol uji yang tersedia;¹⁴ analisis hematologi darah (*white blood cell* (WBC), *red blood cell* (RBC), hemoglobin (Hb), hematokrit (Ht), *mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC), *platelets* (PLT), *the relative distribution width of red blood cells by volume* (RDW-CV), *ratio of large platelets* (P-LCR), *neutrophil* (Neut), dan limfosit (LYMPH)) dilakukan mengacu pada pedoman analisis alat *cell counter* otomatis Sysmex XS-800i®;¹⁵ analisis histopatologi dengan teknik skoring oleh seorang patolog untuk mengevaluasi tingkat kerusakan. Ketentuan skoring adalah sebagai berikut: TKS: Tidak ada kelainan spesifik. Skor 0: Tidak ada sampel. Skor 1: Lesi ringan. Skor 2: Lesi sedang. Skor 3: Lesi parah.¹⁶

Pengolahan data

Data disajikan dalam bentuk rata-rata ± SD. Analisis statistik menggunakan metode *oneway* ANOVA untuk data parameterik atau Kruskal Wallis untuk data non parameterik. Guna melihat perbedaan lebih lanjut antara kelompok dilakukan uji dengan metode *least significancy difference* (LSD) untuk data parameterik atau Mann Whitney untuk data non parameterik. Semua analisis statistik dilakukan menggunakan program SPSS 13 pada tingkat kepercayaan 95% ($p=0,05$).¹⁶

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian keamanan subkronis terhadap FH dilakukan guna mengetahui tingkat keamanan FH jika digunakan pada waktu lama dengan berpedoman pada ketentuan uji non-klinik BPOM. Pengujian bertujuan 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, serta informasi dosis yang tidak menimbulkan efek.⁶

Pengujian dilakukan pada 3 tingkatan dosis. Dosis paling rendah (DOSIS-1) sebesar 75 mg/kg BB adalah dosis khasiat FH dalam menurunkan asam urat.² Dosis tertinggi (DOSIS-3, 1200 mg/kg BB) adalah 4× dosis efektif. Pada dosis ini diharapkan akan diperoleh informasi adanya organ sasaran efek toksik tanpa menyebabkan kematian hewan coba secara bermakna.⁶ Penetapan DOSIS-3 juga harus memperhatikan kemudahan pada pemberian FH kepada hewan coba sebab FH diberikan dalam bentuk suspensi menggunakan sonde lambung dengan volume maksimal pemberian pada hewan adalah 10% BB hewan.¹⁰ DOSIS-2 adalah dosis tengah antara kedua dosis tersebut.

Hasil pengukuran biokimia darah disajikan pada Tabel 1 (hewan jantan) dan Tabel 2 (hewan betina). Data kesehatan ginjal, yaitu kadar urea dan kreatinin, menunjukkan bahwa nilai kedua parameter tersebut tidak berbeda bermakna antara kelompok perlakuan FH dibanding kontrol ($p>0,05$), baik pada hewan jantan maupun betina. Pemberian FH jangka panjang pada ketiga dosis uji tidak menimbulkan gangguan pada kadar kreatinin dan urea. Hal yang sama juga diamati pada parameter kesehatan hati yaitu kadar ASAT, ALAT, gama-GT dan bilirubin total, yakni tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan pada ketiga dosis dan

Tabel 1. Biokimia darah setiap kelompok hewan jantan dan betina

Parameter uji	KONTROL	DOSIS-1	DOSIS-2	DOSIS-3
Hewan jantan				
ASAT (U/L)	86,34±19,90	78,67±9,40	74,09±18,90	85,69±12,20
ALAT (U/L)	44,61±10,68	45,30±11,07	41,08±10,39	41,99±9,48
Gama-GT (U/L)	4,40±1,51	3,81±2,66	3,31±1,59	3,98±2,43
Urea (mg/dL)	45,32±19,25	38,56±16,93	39,03±23,03	42,96±21,99
Kreatinin (mg/dL)	0,54±0,19	0,53±0,16	0,44±0,14	0,50±0,18
Bilirubin total (mg/dL)	1,40±0,46	1,12±0,27	1,34±0,52	1,26±0,38
Hewan betina				
ASAT (U/L)	72,89±15,00	79,54±12,70	76,71±11,4	87,21±27,60
ALAT (U/L)	37,04±6,24	39,04±8,00	36,94±6,37	36,65±7,73
Gama-GT (U/L)	4,36±0,88	4,68±1,31	4,01±0,87	4,51±1,47
Urea (mg/dL)	46,76±21,06	47,42±20,06	42,05±26,75	43,54±26,12
Kreatinin (mg/dL)	0,63±0,16	0,60±0,20	0,65±0,11	0,67±0,20
Bilirubin total (mg/dL)	0,93±0,22	1,10±0,41	1,20±0,60	0,98±0,39

Nilai adalah rata-rata kadar \pm SD. n=8 ekor per kelompok. Pengukuran biokimia darah dilakukan terhadap plasma heparin kecuali kadar urea darah menggunakan serum, menggunakan reagen kit Diasys® dilakukan secara spektrofotometri. DOSIS1, DOSIS2, DOSIS3 mendapat FH 75, 300, 1200 mg/kg BB. KONTROL mendapat pembawa larutan CMC 0,5%.

kontrol ($p > 0,05$), baik pada hewan jantan dan betina. Hal ini berarti bahwa pemberian FH hingga 16 kali dosis efektif selama 7 minggu tidak menunjukkan adanya gangguan organ ginjal dan hati.

Kreatinin adalah sejenis asam amino yang merupakan produk buangan di dalam darah dan diekskresikan melalui ginjal ke dalam urin. Umumnya kreatinin disimpan dalam otot sebagai cadangan energi dalam bentuk kreatinin-fosfat sumber ATP. Tempat lain yang memproduksi kreatinin di hati, pankreas dan ginjal. Kadar kreatinin yang tinggi diduga karena aktivitas otot yang berat (olah raga keras) atau karena sistem pembuangan ginjal yang terganggu. Kadar kreatinin relatif stabil karena tidak dipengaruhi oleh protein dari diet.¹⁸

Urea merupakan hasil metabolisme nitrogen atau katabolisme protein. Pada proses katabolisme protein, gugus amino dilepas dari asam amino dengan proses deaminasi oksidatif, selanjutnya gugus amino akan melalui serangkaian daur ulang, dirombak atau dikeluarkan dari tubuh.

Enzim aminotransferase di beberapa jaringan mengkatalisis pertukaran gugus amino antar senyawa yang terlibat dalam rangkaian reaksi sintesis. Gugus amino yang dilepaskan akan dirombak menjadi amonia dan diangkut ke hati untuk proses pembentukan urea, yang selanjutnya akan diangkut ke ginjal untuk diekresikan ke urin. Sekitar 50% urea yang difiltrasi oleh glomerulus akan direabsorpsi kembali di tubulus. Sebaliknya, sel-sel tubulus tidak permeabel terhadap kreatinin, insulin dan manitol sehingga semua akan diekresikan melalui urin. Sejumlah urea akan dimetabolisme lebih lanjut sebagian kecil diekresikan melalui keringat dan feses. Konsentrasi urea dalam darah dipengaruhi oleh keseimbangan pembentukan urea dan katabolisme protein serta kemampuan ekskresi urea oleh ginjal. Peningkatan kadar urea dapat disebabkan oleh karena terjadi peningkatan katabolisme protein jaringan yang disertai dengan keseimbangan nitrogen yang negatif, proses pemecahan protein yang berlebihan terjadi pada kasus leukemia

dimana terjadi pelepasan protein leukosit, adanya gangguan ekresi urea, karena gangguan prerenal, renal atau postrenal atau dikarenakan konsumsi makanan tinggi protein.¹⁹ Pemeriksaan kadar kreatinin dan urea darah menjadi acuan untuk mengetahui adanya gangguan fungsi ginjal. Gangguan fungsi ginjal menyebabkan penurunan kecepatan filtrasi ginjal, disertai dengan penumpukan sisa metabolisme (ureum dan kreatinin) dalam darah sehingga kadar kedua zat ini dalam darah ini dapat digunakan sebagai indikator derajat kesehatan ginjal.

Enzim ALAT dan ASAT berperan dalam mengkatalis transfer gugus amin dari glutamat untuk menghasilkan asam amino alanin dan aspartat pada siklus asam sitrat.²⁰ Kadar ASAT dan ALAT yang melebihi kontrol menunjukkan adanya gangguan terhadap keutuhan sel hepatosit. Jika ada kerusakan hepatosit, ALAT dan ASAT akan dikeluarkan ke dalam aliran darah sehingga ditemukan kadar dalam darah tinggi. ALAT dan ASAT juga diproduksi di jantung, otot, ginjal, otak, sel darah merah dan otot dalam kadar rendah. Sementara itu, peningkatan kadar Gama-GT dan bilirubin menunjukkan adanya gangguan fungsi hati terkait kholestatis. Gama-GT berkaitan dengan fungsi mengkatalisis perpindahan gugus gama-glutamil dari suatu peptida ke asam amino. Adanya peningkatan kadar dalam darah menunjukkan adanya inflamasi awal saluran empedu. Bilirubin berfungsi mengkonjugasi senyawa glukoronat pada produk hemolisis sehingga diperoleh senyawa kompleks yang larut air memudahkan diekresikan melalui empedu. Adanya peningkatan bilirubin menjadi indikator kelainan fungsi hati.²¹

Hasil pengukuran hematologi lengkap dengan 10 parameter disajikan pada Tabel 2. Secara statistik, pada hewan jantan, semua parameter hematologi tidak berbeda bermakna antara ketiga kelompok perlakuan FH dibanding kontrol ($p > 0,05$). Sementara

itu, pada hewan betina juga menunjukkan hasil yang sama kecuali pada kelompok DOSIS-2 dimana kadar *neutrophil* (NEUT) menunjukkan ada perbedaan bermakna dibanding kontrol ($p < 0,05$). Kadar neutrophil pada DOSIS-2 lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol ($0,7 \times 10^3/\mu\text{L}$ terhadap $1,5 \times 10^3/\mu\text{L}$). Kondisi ini menunjukkan bahwa hewan betina lebih rentan dibanding hewan jantan. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa pengujian toksisitas umumnya menunjukkan bahwa hewan betina lebih sensitif dibandingkan hewan jantan.²² Sistem hematopoiesis merupakan salah satu sistem yang sangat sensitif terhadap senyawa toksik.²³ Pada dosis yang lebih tinggi (DOSIS-3) tidak ditemukan kondisi yang sama. Tidak ditemukan adanya keteraturan antara peningkatan dosis akan menghasilkan peningkatan efek toksik. Kemungkinan penyebab hal ini hanya efek beberapa ekor saja yang menyimpang diantara hewan yang ada dalam satu kelompok. Hasil ini menyerupai dengan penelitian yang dilakukan oleh Bo Li B, *et al.*²⁴ yang mempelajari efek toksik jangka panjang pemberian ekstrak bunga teh. Bo Li B menemukan bahwa beberapa parameter hematologi darah tidak memiliki pola yang konsisten antara peningkatan dosis dengan perubahan parameter hematologi dan terhadap waktu pengukuran. Pola yang tidak tetap ini diduga disebabkan adanya variasi dari sedikit hewan coba dalam satu kelompok dan tidak dapat dikatakan bahwa sampel uji memberikan efek toksik terhadap parameter dimaksud.

Hasil skoring derajat kerusakan organ hati, ginjal, lambung, usus halus dan jantung (Tabel 3) menunjukkan bahwa pada kontrol jantan dan betina ditemukan adanya kelainan atau lesi dengan derajat ringan pada organ hati dan ginjal. Hal ini menunjukkan bahwa hewan yang digunakan tidak termasuk jenis *specific pathogen free (SPF)*, sehingga

kemungkinan adanya lesi sudah merupakan bawaan hewan tersebut. Analisis histologi pada kelompok yang diberi dosis 1, hewan jantan dan betina, ditemukan adanya perubahan histologi/lesi khususnya pada

organ hati, ginjal, jantung dan usus halus, namun kelainan tersebut secara statistik tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan kontrol ($p > 0,05$).

Tabel 2. Hematologi lengkap pada hewan jantan dan betina

Parameter uji		KONTROL	DOSIS-1	DOSIS-2	DOSIS-3
Hewan jantan					
WBC	$\times 10^3/\mu\text{L}$	14,8 \pm 2,5	14,2 \pm 1,7	13,9 \pm 3,7	14,2 \pm 2,2
RBC	$\times 10^6/\mu\text{L}$	8,1 \pm 0,5	7,8 \pm 0,4	8,1 \pm 0,2	8,0 \pm 0,5
Hb	g/dL	14,9 \pm 0,7	14,5 \pm 0,7	14,9 \pm 0,4	14,5 \pm 0,6
Ht	%	43,4 \pm 1,6	42,4 \pm 1,7	43,6 \pm 0,9	42,3 \pm 1,6
MCHC	g/dL	34,4 \pm 0,4	34,1 \pm 0,4	34,3 \pm 0,4	34,3 \pm 0,4
PLT	$\times 10^3/\mu\text{L}$	479,0 \pm 92,4	475,0 \pm 175,2	547,0 \pm 61,9	489,0 \pm 112,3
RDW-CV	%	18,9 \pm 3,0	17 \pm 0,8	17,7 \pm 0,4	17,9 \pm 1,1
P-LCR	%	12,9 \pm 1,7	10,6 \pm 1,1	12,1 \pm 1,7	10,9 \pm 1,5
NEUT	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2,0 \pm 0,8	1,7 \pm 1,0	1,5 \pm 0,6	2,3 \pm 0,6
LYMPH	$\times 10^3/\mu\text{L}$	10,1 \pm 4,1	8,7 \pm 5,1	8,4 \pm 3,1	10,4 \pm 2,1
Hewan betina					
WBC	$\times 10^3/\mu\text{L}$	12,3 \pm 1,6	11,8 \pm 1,6	13,1 \pm 2,8	12,7 \pm 3,4
RBC	$\times 10^6/\mu\text{L}$	7,3 \pm 0,5	7,5 \pm 0,2	7,7 \pm 0,4	7,5 \pm 0,2
Hb	g/dL	14,3 \pm 0,9	14,2 \pm 0,3	14,4 \pm 0,7	14,0 \pm 0,5
Ht	%	41,0 \pm 2,4	40,8 \pm 0,6	41,5 \pm 2,0	40,4 \pm 1,1
MCHC	g/dL	34,8 \pm 0,4	32,0 \pm 6,5	34,7 \pm 0,4	34,6 \pm 0,5
PLT	$\times 10^3/\mu\text{L}$	401,7 \pm 157,4	348,5 \pm 136,8	588,4 \pm 213,3	325,8 \pm 149,1
RDW-CV	%	14,5 \pm 1,1	14,5 \pm 0,6	14,9 \pm 0,6	15,3 \pm 1,2
P-LCR	%	13,3 \pm 2,1	11,4 \pm 2,4	11,0 \pm 1,1	9,8 \pm 3,5
NEUT	$\times 10^3/\mu\text{L}$	1,5 \pm 0,3	1,3 \pm 0,2	0,7 \pm 0,2*	2,0 \pm 0,7
LYMPH	$\times 10^3/\mu\text{L}$	9,9 \pm 1,3	9,8 \pm 1,6	5,6 \pm 0,6	9,8 \pm 2,8

*Berbeda bermakna dibanding kelompok kontrol ($p < 0,05$). $n=8$ ekor per kelompok. Pengukuran hematologi lengkap dilakukan terhadap darah-EDTA menggunakan alat otomatis Sysmex XS800i@. DOSIS1, DOSIS2, DOSIS3 mendapat FH 75, 300, 1200 mg/kg BB. KONTROL mendapat pembawa larutan CMC 0,5%.

Tabel 3. Hasil skoring derajat kerusakan organ

Kelompok	Jantung	Lambung	Usus halus	Hati	Ginjal
Hewan jantan					
KONTROL	0,0	0,0	0,5	0,8	1,0
DOSIS-1	0,1	0,0	0,3	1,0	1,0
DOSIS-2	0,3	0,0	0,9	1,9*	1,4
DOSIS-3	0,3	0,0	1,4*	2,6*	1,8*
Hewan betina					
KONTROL	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0
DOSIS-1	0,4	0,0	0,1	1,3	1,3
DOSIS-2	0,3	0,0	0,3	1,6*	1,4*
DOSIS-3	0,2	0,0	0,1	2,1*	2,0*

*Secara statistik berbeda secara bermakna dibanding control ($p < 0,05$). Nilai = rata-rata skoring. $n=8$ ekor per kelompok. Analisis histopatologi dengan teknik skoring oleh seorang patolog untuk mengevaluasi tingkat kerusakan. Ketentuan skoring: TKS: Tidak ada kelainan spesifik. Skor 0: Tidak ada sampel. Skor 1: Lesi ringan. Skor 2: Lesi sedang. Skor 3: Lesi parah. DOSIS1, DOSIS2, DOSIS3 mendapat FH 75, 300, 1200 mg/kg BB. KONTROL mendapat pembawa larutan CMC 0,5%.

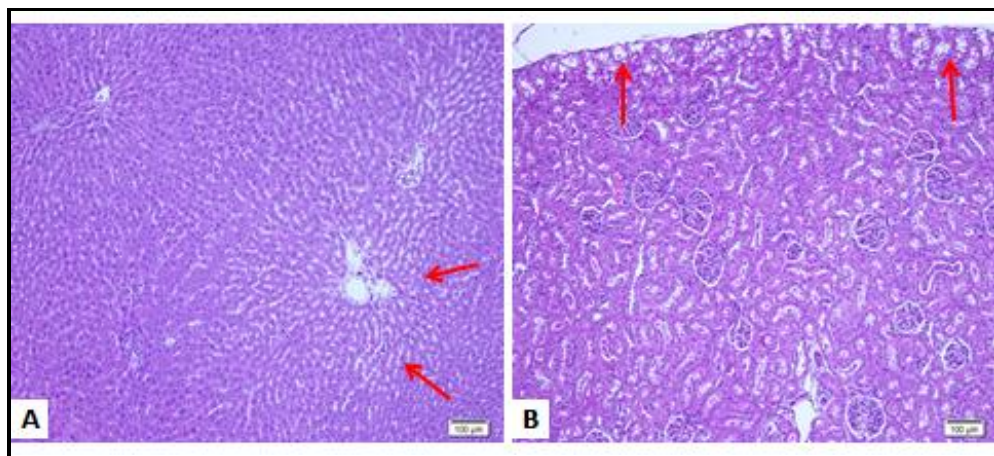
Pada gambar 1 dapat dilihat lesi pada organ hati dan ginjal hanya berupa lesi ringan. Kelompok DOSIS-1 tidak ditemukan lesi pada organ lambung.

Efek kerusakan organ akibat perlakuan FH DOSIS-2 terhadap kelima jenis organ pada hewan betina lebih parah dibanding jantan. Pada hewan jantan kerusakan yang bermakna ditemukan hanya pada organ hati (vs kontrol, $p < 0,05$). Sementara pada hewan betina ditemukan pada dua organ yaitu organ hati dan ginjal (vs kontrol, $p < 0,05$). Organ yang lain tidak terjadi kerusakan yang bermakna.

Selanjutnya, perlakuan FH DOSIS-3 pada hewan jantan ditemukan lesi yang bermakna pada organ hati, ginjal dan usus (vs kontrol, $p < 0,05$). Sementara, pada hewan betina ditemukan pada organ hati dan ginjal vs kontrol, $p < 0,05$). Kondisi ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis FH akan menambah keparahan lesi beberapa organ hal ini disebabkan semakin besar jumlah FH yang masuk ke dalam tubuh. FH merupakan ekstrak tanaman yang mengandung berbagai macam senyawa

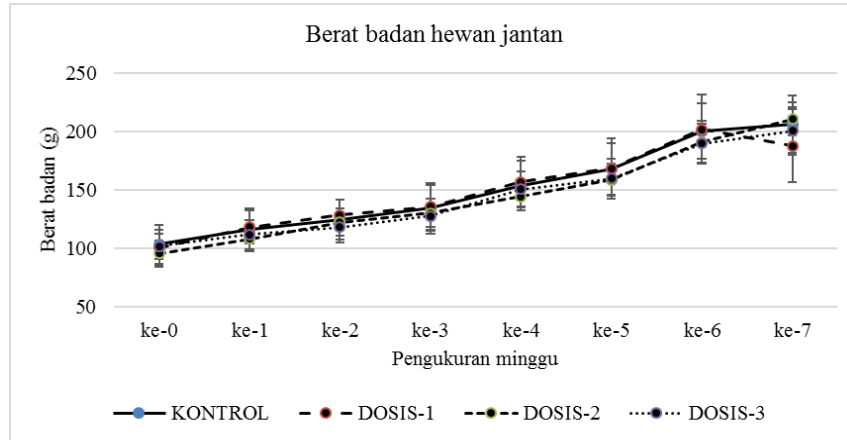
kimia seperti katekin, polifenol, dan flavonoid.²⁵ Sampai pada takaran tertentu tubuh masih bisa mengantisipasi bahan asing yang masuk ke dalam tubuh, namun pada jumlah yang berlebih maka akan berpengaruh terhadap beberapa organ, khususnya yang terlibat langsung pada proses detoksifikasi dan ekskresi.

Hasil pengamatan penimbangan berat badan selama pelaksanaan pengujian untuk hewan jantan (Gambar 2) dan betina (Gambar 3) menunjukkan bahwa pemberian FH pada ketiga dosis uji tidak menyebabkan penurunan BB secara berarti, baik pada hewan jantan maupun hewan betina. BB hewan jantan dan betina selama pengujian cenderung meningkat. Terlihat bahwa berat badan rata-rata setiap minggu dari setiap kelompok berfluktuasi, namun secara umum terdapat kecenderungan peningkatan. Data konsumsi pakan mendukung hasil pengukuran berat badan, yaitu tidak terdapat perbedaan secara signifikan ($p > 0,05$) antara kontrol dengan kelompok yang mendapat FH pada ketiga dosis uji pada kedua jenis kelamin (Tabel 4). Konsumsi pakan akan



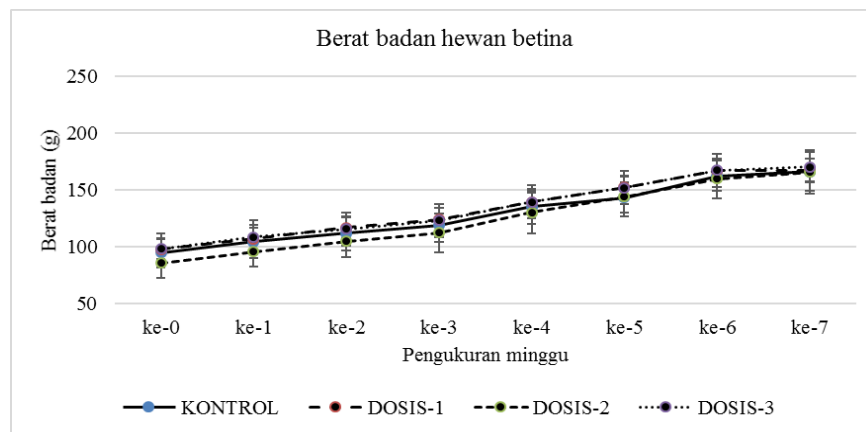
Gambar 1. Gambaran kerusakan/lesi histopatologi organ hati dan ginjal hewan dengan perlakuan FH Dosis 1.

Keterangan: Pewarnaan dilakukan menggunakan Hematoksilin dan Eosin. A. Histopatologi organ hati, terjadi dilatasi sinusoid hati (tanda panah). B. Histopatologi organ ginjal, terjadi degenerasi sel tubulus ginjal (tanda panah).



Gambar 2. Rata-rata berat badan hewan jantan selama pengujian

Keterangan: Penimbangan berat badan dilakukan setiap minggu. n=8 ekor. Data = rata-rata±SD. DOSIS1, DOSIS2, DOSIS3 mendapat FH 75, 300, 1200 mg/kg BB. KONTROL mendapat pembawa larutan CMC 0,5%.



Gambar 3. Rata-rata berat badan hewan betina selama pengujian

Keterangan: Berat badan hewan ditimbang setiap minggu. n=8 ekor. Data = rata-rata ± SD. DOSIS1, DOSIS2, DOSIS3 mendapat FH 75, 300, 1200 mg/kg BB. KONTROL mendapat pembawa larutan CMC 0,5%.

berefek secara langsung pada berat badan hewan coba. Pada studi toksisitas, hewan coba yang mendapat dosis tinggi umumnya akan kehilangan berat badan yang disebabkan penurunan nafsu makan.

Perubahan berat badan secara nyata merupakan indikator yang paling mudah terlihat dan menjadi indikator awal adanya efek toksik dari sampel uji yang diberikan.¹⁹ Ekstrak secang sudah dikenal sejak lama dan digunakan dalam bidang pangan sebagai pewarna dan juga sebagai obat. Peneliti sebelumnya telah membuktikan bahwa secang terbukti aman pada pengujian

keamanan secara *in vitro* dan *in vivo*. Senyawa utama secang, brazilin, dan fraksi kaya brazilin sampai dengan konsentrasi 500 µg/mL tidak menunjukkan efek toksik pada sel fibroblast yang diinkubasi selama 24 jam. Brazilin juga tidak menyebabkan sitotoksitas pada konsentrasi di bawah 300 µM pada sel RAW264.7 pada inkubasi selama 18 jam. Demikian juga inkubasi brazilin selama 24 jam hingga konsentrasi 100 µM tidak mengubah viabilitas sel fibroblast dermal.³

Pengujian keamanan pada hewan coba menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air

secang sekali pada dosis hingga 5000 mg/kg BB per oral tidak menunjukkan adanya gejala gangguan efek klinik, mortalitas dan perubahan berat organ. Selanjutnya, pemberian ekstrak etanol secang pada dosis 250, 500, dan 1000 mg/kg bb per oral selama 30 hari menunjukkan bahwa tidak ditemukan adanya abnormalitas berat organ dan berat badan, hematologi, biokimia dan histologi organ jika dibandingkan dengan kontrol, baik pada hewan jantan maupun betina.³

Secang juga memiliki perlindungan terhadap kerusakan hati melalui mekanisme antioksidan. Pemberian ekstrak etanol secang pada dosis 500 mg/kg BB mampu meningkatkan enzim-enzim antioksidan tikus yang dipapar dengan parasetamol seperti superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT) serta kelompok glutathione seperti *glutathione peroxidase* (GPX), *glutathione-s-transferase* (GST) dan *reduced glutathione* (GSH). Selain itu, secang juga mampu memperbaiki makroinflamasi yang setara dengan silimaritin 25 mg/kg BB akibat induksi parasetamol.⁹

Keamanan ekstrak gambir telah diteliti dalam beberapa penelitian sebelumnya. Hasil analisis sitotoksitas *in vitro* ekstrak etanol gambir terhadap sel Vero menunjukkan nilai IC_{50} antara 400-500 ppm.¹⁰ Graidist P et al menyatakan bahwa sampel ekstrak bahan alam yang mempunyai nilai IC_{50} lebih besar dari 80 ppm pada uji sitotoksitas terhadap sel kontrol *in vitro* termasuk dalam kategori kurang toksik.²⁶ Uji sitotoksitas terhadap ekstrak air gambir terhadap sel epitel intestinal lestari IEC-6 menunjukkan bahwa sampai konsentrasi 200 ppm, tingkat kehidupan sel masih bertahan hingga 93%.¹¹

Selain aman, baik ekstrak dan senyawa kimia gambir mempunyai aktivitas biologi melindungi kerusakan tubuh dari serangan radikal bebas. Senyawa kimia utama gambir, yakni flavonoid (+) katekin memiliki

aktivitas antioksidan yang tidak berbeda jauh dengan vitamin C. Pada pengujian dengan metode ABTS (*2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*) dan NBT (*Nitroblue tetrazolium*), (+)katekin meredam radikal bebas dengan nilai IC_{50} pada konsentrasi 40,47 ppm dan 9,36 ppm pada setiap metode, sementara itu senyawa standar vitamin C menunjukkan nilai IC_{50} masing-masing 11,4 ppm dan 9,04 ppm.²⁷ Yunarto et al menguji aktivitas antioksidan ekstrak terpurifikasi gambir dan menghasilkan bahwa aktivitas antioksidannya lebih baik dari vitamin C.²⁸ Ekstrak air gambir juga mampu menekan peningkatan kadar MDA hati dan serum akibat induksi CCl_4 , namun tidak bermakna dibanding kelompok kontrol.²⁹

Sampel uji merupakan kombinasi dari ekstrak bahan alam sehingga terdapat kemungkinan terjadi interaksi antar komponen, terutama interaksi yang bersifat antagonis pada dosis yang lebih tinggi. Ketepatan dosis adalah salah satu faktor penting dalam menentukan sukses tidaknya terapi dengan obat tradisional.³⁰ Selain itu, efek kontra indikasi antara beberapa senyawa aktif pada obat tradisional juga dapat terjadi, misalnya efek antioksidan akan berkurang jika dosis gambir terlalu tinggi.³¹ Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil studi yang dilakukan oleh Hilpiani yang melakukan uji toksisitas akut terhadap ekstrak etil asetat gambir. Ditemukan adanya lesi pada organ hati berupa sel radang akut pada dosis pemberian 8000 mg/kg BB, sedangkan pada dosis 1000, 2000 dan 4000 mg/kg BB tidak terdapat lesi yang bermakna.¹²

KESIMPULAN

Pemberian FH pada dosis 75 mg/kg bb selama 7 minggu pada tikus jantan dan betina galur Sprague Dawley terbukti aman,

tidak memengaruhi kadar kimia darah (urea, kreatinin, bilirubin total, ASAT, ALAT dan gama-GT) dan hematologi darah (WBC, RBC, HGB, HCT, MCHC, PLT, RDW-CV, P-LCR, PCT, NEUT, LYMPH), tidak menyebabkan kerusakan/lesi organ jantung, lambung, usus, hati dan ginjal, serta tidak menyebabkan penurunan berat badan hewan dan konsumsi pakan yang bermakna dibanding kontrol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kemenristekdikti atas bantuan pendanaan penelitian ini melalui kegiatan Kegiatan INSINas 2015 dan kepada Pusat Teknologi Farmasi dan Medika (Pusat TFM), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi yang telah menyediakan sarana dan prasarana untuk pelaksanaan penelitian. Demikian juga, terima kasih disampaikan kepada asisten laboratorium farmakologi Pusat TFM yaitu Julham Effendi dan Dea Kurniadi yang telah membantu dalam pemeliharaan hewan percobaan.

DAFTAR RUJUKAN

1. Zhao X, Zhu JX, Mo SF, Pan Y, Kong LD. Effects of cassia oil on serum and hepatic uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006 Feb 20;103(3): 357–65.
2. Ningsih S, Risma E, Srijanto B, Supriyono A, Nizar, Fahrudin F, et al. Pengembangan obat herbal terstandar berbasis gambir sebagai penurun asam urat. Disampaikan pada Seminar Ilmiah Insentif Riset SINas, Kementerian Riset dan Teknologi: Membangun Sinergi Riset Nasional untuk Kemandirian Teknologi; 1-2 Oktober 2014; Bandung, Indonesia.
3. Nirmal NP, Rajput MS, Prasad RGSV, Ahmad M. Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities: A Review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2015 Jun;8(6):421–30.
4. Hussin MH, Kassim MJ. The corrosion inhibition and adsorption behavior of *Uncaria gambir* extract on mild steel in 1 M HCl. *Material Chemistry and Physics*. 2011 Feb;125(3):461-8.
5. Widiyarti G, Sundowo A, Hanafi M. The free radical scavenging and anti-hyperglycemic activities of various gambiers available in Indonesian market. *Makara Sains*. 2011 Nov;15(2):129-34.
6. Republik Indonesia. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 tahun 2014 tentang Pedoman uji toksisitas nonklinik secara *in vivo*. *Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 875*. Jakarta: Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia; 2014.
7. Nalla MK, Elsani MM, Chinnala KM. Effect of *Caesalpinia sappan* Linn chloroform extract on alloxan induced diabetes mellitus in rats. *World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. 2015;4(6):1480-9.
8. Hasti S, Muchtar H, Bakhtia A. Uji aktivitas hepatoproteksi dan toksisitas akut dari ekstrak gambir terstandarisasi. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*. September 2012;1(1):34-8.
9. Sarumathy K, Vijay T, Palani S, Sakthivel K, Rajan MSD. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Caesalpinia sappan* against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *International Journal of Pharmacology and Therapeutics*. 2011;1:19-31.
10. Ningsih S. Efek hepatoprotektor gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) dalam menghambat pembentukan kolagen dengan menekan TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-1*) *in vivo* [disertasi]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2015.
11. Anggraini T, Tai A, Yoshino T, Itani T. Antioxidative activity and catechin content of four kinds of *Uncaria gambir* extracts from West Sumatra Indonesia. *African Journal of Biochemistry Research*. 2011;5(1):33-38.
12. Hilpiani D. Uji toksisitas akut isolat katekin gambir (*Uncaria gambir* Roxb) dari fase etil asetat terhadap mencit putih jantan secara *in vivo* [skripsi]. Jakarta: Universitas Islam

- Negeri Syarif Hidayatullah; 2012.
13. Sulistyaningrum N, Rustanti L, Alegantina S. Uji mutagenik ames untuk melengkapi data keamanan ekstrak gambir (*Uncaria gambir* Roxb.). Jurnal Kefarmasian Indonesia. 2012 Feb 28;3(1):36-45.
 14. Diasys Diagnostic Systems [Internet]. Date unknown [cited 2017 Feb 21]. Available from: http://www.diasys-diagnostics.com/fileadmin/promotoolbox/DiaSys_catalogues/DiaSys_Katalog_RZ_170121.pdf?_=1485779300
 15. Automated Hematology Analyzer XS Series XS-1000i/XS-800i Instruction for use. Kobe: Sysmex Corporation; 2006.
 16. Say CE, editor. Histopathology: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Vol. 1180. New York: Springer Science-Business Media; 2014.
 17. Dahlan MS. Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan: Deskriptif, bivariat dan multivariat dilengkapi dengan aplikasi dengan menggunakan SPSS. Edisi 5. Jakarta: Penerbit Salemba Medika; 2009.
 18. Adebayo AH, Zeng GZ, Zhang YM, Ji CJ, Akindahunsi AA, Tan NH. Toxicological evaluation of precocene II isolated from *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) in Sprague Dawley rats. African Journal of Biotechnology. 2010;9(20):2938-44.
 19. Sireeratawong S, Piyabhan P, Singhalak T, Wongkrajang Y, Tamsiririrkkul R, Punsirat J, et al. Toxicity evaluation of sappan wood extract in rats. J Med Assoc Thai. 2010;93(7):S50-S57.
 20. Thapa BR, Walia A. Liver Function Tests and their Interpretation. Indian Journal of Pediatrics. 2007 July;74:663-71.
 21. BPAC (Best Practice Advocacy Centre). Liver function testing in primary care [Internet]. 2007 [cited 2013 Feb 27] Available from: http://www.bpac.org.nz/resources/campaign/lft/bpac_lfts_poem_wv.pdf.
 22. Mir AH, Sexena M, Malla MY. An acute oral toxicity study of methanolic extract from *Tridax procumbens* in Sprague Dawley's rats as per OECD guidelines 423. Asian Journal of Plant Science and Research. 2013;3(1):16-20.
 23. Adeneye AA, Ajagbonna OP, Adeleke TI, Bello SO. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. Journal of Ethnopharmacology 2006;105, 374-379.
 24. Bo Li B, Jin Y, Xu Y, Wu Y, Xu J, Tu Y. Safety evaluation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) flower extract: Assessment of mutagenicity, and acute and subchronic toxicity in rats. Journal of Ethnopharmacology. 2011;133:583-90.
 25. Ningsih S, Wibowo AE, Indriyani HN, Efendi J, Mufidah R. Pengembangan sediaan farmasi penurun asam urat berbasis gambir (*Uncaria gambir* (HUNTER) ROXB). Laporan akhir Program Insentif Riset Sistem Inovasi Nasional (InSinas) 2016. Jakarta: Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan. Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi; 2016.
 26. Graidist P, Martla M, Sukpondma Y. Cytotoxic activity of *Piper cubeba* extract in breast cancer cell lines. Nutrients. 2015;7:2707-18.
 27. Raj PV. Exploration of hepatoprotective mechanisms of actions of some known hepatoprotective agents through bax pathway [PhD dissertation]. Manipal: Manipal University; 2010.
 28. Yunarto N, Aini N. Effect of purified gambir leaves extract to prevent atherosclerosis in rats. Health Science Journal of Indonesia. 2015;6(2 Des):105-10.
 29. Edward Z. The function utilization of gambier (*Uncaria gambir*) as the hepatoprotector. Riset Kimia. 2009;2(2).
 30. Katno. Tingkat manfaat keamanan dan efektifitas tanaman obat dan obat tradisional. Prapti IY, Rahmawati N, Mujahid R, Widyastuti Y, editor. Karanganyar: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Badan Penelitian Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI; 2008
 31. Frinanda D, Efrizal, Resti R. Efektivitas gambir (*Uncaria gambir* Roxb) sebagai antihiperkolesterolemia dan stabilisator nilai darah pada mencit putih (mus musculus) jantan. Jurnal Biologi Universitas Andalas. 2014 September;3(3):231-237.