

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL DAUN PLETEKAN  
(*Ruellia tuberosa* L.) PADA MENCIT BETINA (*Mus musculus*)  
GALUR BALB/c**



**Oleh :**

**Novi Astuti  
19133878A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2017**

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL DAUN PLETEKAN  
(*Ruellia tuberosa* L.) PADA MENCIT BETINA (*Mus musculus*)  
GALUR BALB/c**

*SKRIPSI*

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai  
derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)  
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi*

**Oleh :**

**Novi Astuti  
19133878A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2017**

**PENGESAHAN SKRIPSI**

Berjudul  
**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL DAUN PLETEKAN  
(*Ruellia tuberosa* L.) PADA MENCIT BETINA (*Mus musculus*)  
GALUR *BALB/c***

Oleh :

**Novi Astuti  
19133878A**

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Pada tanggal : 05 Juni 2017

Mengetahui,  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi



Prof. Dr. R. A. Setiawan, SU., MM., M.Sc., Apt.

Pembimbing,

Ika Purwidyaningrum, M.Sc., Apt.

Pembimbing Pendamping,

Ghani Nurfiana, M.Farm., Apt.

Penguji :

1. Fransiska Leviana, S.Farm., M.Sc., Apt

1.....

2. Endang Sri Rejeki, M.Si., Apt.

2.....

3. Meta Kartika Untari, M.Sc., Apt.

3.....

4. Ika Purwidyaningrum, M.Sc., Apt.

4.....

## PERSEMBAHAN

Syukur kepadamu ya Allah, atas limpahan karuniamu, atas segala nikmat dariMu yang tak bisa ku hitung, atas perlindunganMu, atas ujianMu. Engkaulah yang Maha Pemurah lagi Maha Penyayang. Sholawat serta salam kepadaMu ya Rasulullah atas perjuangan dan tauladan yang engkau berikan.

*“Man jadda wajad, man shabara zhafira, man saara ala darbi washala”*

*(Barangsiapa yang bersungguh-sungguh pasti akan berhasil, barang siapa yang bersabar pasti akan beruntung, barang siapa yang berjalan di jalanNya pasti akan sampai)*

*Mustahil adalah bagi mereka yang tidak pernah mencoba – Jim Goodwin*

*Berusahalah untuk tidak menjadi manusia yang berhasil tapi berusahalah menjadi manusia yang berguna. ~ Einstein*

### **Skripsi ini penulis persembahkan untuk :**

Orang tuaku

Bp. Larno – Ibu Surati

Yang telah membesarkan penulis, atas perjuanganmu, doamu, cintamu, kasih sayangmu yang telah mengalir tiada batas.

Nenekku dan seluruh keluarga besarku

Terimakasih atas doa dan dukungan yang telah diberikan selama ini.

Sahabat-sahabatku

Sarah Sarahe, Novita Prito, Dhevi Probowati, kakak tersayangku Budi, team pejuang toksik dan teman-teman FKK3. Terimakasih atas doa, semangat dan kebersamaanya selama ini.

Almamater kebanggaan

**Universitas Setia Budi Surakarta**

Tempat penulis menimba ilmu pengetahuan farmasi

Bangsa dan negaraku

**Indonesia**

## PERNYATAAN

Ssaya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, Juni 2017



Novi Astuti

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah hirabbil alamin, segala puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena dengan Rahmat, Ni'mat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul **“UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK DAUN PLETEKAN (*Ruellia tuberosa* L.) PADA MENCIT BETINA (*Mus musculus*) GALUR BALB/c”**

Skripsi ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi (S.Farm) Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, bimbingan serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis dengan senang hati menyampaikan terimakasih kepada :

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Ika Purwidyaningrum M.Sc., Apt. selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, memberi nasehat, petunjuk dan bimbingan kepada penulis selama penyusunan skripsi.
4. Ghani Nurfiana, M.Farm., Apt selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu, memberi nasehat, petunjuk dan bimbingan kepada penulis selama penyusunan skripsi.
5. Segenap dosen, asisten & staff Laboratorium, serta karyawan perpustakaan yang telah banyak membantu dan menyediakan fasilitas demi kelancaran skripsi.
6. Orang tua dan saudara-saudaraku yang selalu ku cintai terimakasih atas doa dan kasih sayangnya, serta dorongannya baik dalam hal moril dan materiil.
7. Teman seperjuangan khususnya tim akut, dan teman-teman angkatan 2013 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan dorongan dan informasi yang penulis perlukan dalam menyusun skripsi.

8. Serta semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi dan jauh dari kata sempurna, oleh karena itu kritik dan saran dari pembaca yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Akhirnya, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pemngembangan ilmu pengetahuan di bidang obat tradisional kedepannya.

Surakarta, Juni 2017

Novi Astuti

## DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI .....	ii
PERSEMBAHAN .....	iii
PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xv
ABSTRACT .....	xvi
BAB I PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang Masalah .....	1
B. Rumusan Masalah .....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Kegunaan Penelitian .....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	4
A. Tanaman Pletekan .....	4
1. Sistematika tanaman.....	4
2. Nama lain tanaman pletekan .....	4
3. Morfologi tanaman pletekan .....	4
4. Kegunaan di masyarakat .....	5
5. Kandungan kimia .....	5
5.1. Alkaloid.....	5
5.2. Flavonoid.....	5
5.3. Saponin.....	6
5.4. Tanin.....	6
B. Simplisia .....	6
1. Pengertian simplisia .....	6
1.1. Simplisia nabati.....	6

1.2. Simplisia hewani. ....	7
1.3. Simplisia pelikan atau mineral. ....	7
2. Pengumpulan .....	7
3. Pengeringan .....	7
4. Penyimpanan .....	8
C. Penyarian .....	8
1. Pengertian penyarian .....	8
2. Ekstraksi .....	9
2.1 Perkolasi. ....	9
2.2 Refluks. ....	9
2.3 Soxhlet.....	9
2.4 Digesti. ....	10
2.5 Infus.....	10
2.6 Dekok. ....	10
2.7 Maserasi. ....	10
3. Pelarut.....	11
D. Uji Toksisitas.....	11
1. Toksisitas spesifik .....	12
2. Toksisitas non spesifik .....	12
2.1 Toksisitas akut.....	12
2.2 Toksisitas sub kronik.....	12
2.3 Toksisitas kronik. ....	13
E. Toksisitas Akut.....	13
F. Organ Sasaran.....	16
1. Hati .....	16
2. Jantung.....	16
3. Ginjal .....	17
4. Lambung.....	17
5. Paru-paru .....	18
6. Usus .....	18
G. Hewan Percobaan .....	19
1. Sistematika mencit .....	20
2. Karakteristik utama mencit .....	20
3. Kondisi ruang dan pemeliharaan hewan uji .....	20
4. Pengambilan dan pemegangan .....	21
5. Perlakuan oral.....	21
6. Pengamatan gejala hewan percobaan .....	21
6.1 Perubahan perilaku ( <i>behavioral profile</i> ). ....	21
6.2 Perubahan pada <i>neurological profile</i> . ....	22
6.3 Perubahan pada <i>autonomic profile</i> . ....	22
7. Mengorbankan hewan uji .....	23
H. Landasan Teori .....	24
I. Hipotesis .....	25
 BAB III METODE PENELITIAN .....	 26
A. Populasi dan Sampel.....	26

B.	Variabel Penelitian .....	26
1.	Identifikasi variabel utama .....	26
2.	Klasifikasi variabel utama .....	26
3.	Definisi operasional variabel utama .....	27
C.	Alat dan Bahan .....	28
1.	Alat .....	28
2.	Bahan .....	28
D.	Jalannya Penelitian .....	28
1.	Determinasi tanaman .....	28
2.	Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk daun pletekan ....	28
3.	Penetapan susut pengeringan .....	29
4.	Penetapan kadar air .....	29
5.	Pembuatan ekstrak etanolik daun pletekan .....	29
6.	Pemeriksaan bebas alkohol .....	30
7.	Identifikasi senyawa serbuk daun pletekan .....	30
6.1.	Identifikasi saponin. ....	30
6.2.	Identifikasi flavonoid. ....	31
6.3.	Identifikasi alkaloid. ....	31
6.4.	Identifikasi tanin. ....	31
8.	Identifikasi senyawa ekstrak etanol daun pletekan .....	31
8.1	Identifikasi saponin. ....	31
8.2	Identifikasi flavonoid. ....	31
8.3	Identifikasi alkaloid. ....	31
8.4	Identifikasi tanin. ....	32
9.	Penentuan dosis .....	32
9.1	Dosis CMC-Na 0,5 % .....	32
9.2	Dosis sediaan uji .....	32
10.	Uji efek toksisitas akut .....	32
E.	Analisis Hasil .....	35
<b>BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....</b>		<b>37</b>
A.	Hasil dan Pembahasan Penelitian .....	37
1.	Determinasi tanaman .....	37
2.	Hasil pengambilan bahan .....	37
3.	Hasil pembuatan serbuk tanaman .....	37
4.	Hasil penetapan kelembaban serbuk tanaman .....	37
5.	Hasil penetapan kadar air serbuk tanaman .....	38
6.	Pembuatan ekstrak .....	38
7.	Identifikasi kandungan kimia daun pletekan .....	39
8.	Hasil uji bebas etanol ekstrak daun pletekan .....	40
9.	Penetapan dosis .....	40
B.	Hasil dan Pembahasan Uji Toksisitas Akut .....	41
1.	Hasil uji efek toksisitas akut sediaan uji ekstrak daun pletekan .....	41
2.	Hasil pengamatan gejala toksik .....	42
2.1	Perubahan perilaku ( <i>behavioral profile</i> ). ....	42

2.2	Perubahan pada <i>neurological profile</i> .....	44
2.3	Perubahan pada <i>autonomic profile</i> .....	45
3.	Hasil pengamatan berat badan.....	47
4.	Hasil pengamatan bobot organ .....	48
5.	Hasil pengamatan organ secara makroskopis.....	49
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN .....	50
A.	Kesimpulan.....	50
B.	Saran .....	50
DAFTAR PUSTAKA	.....	51
LAMPIRAN	.....	54

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tanaman pletekan .....	4
Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak daun pletekan.....	30
Gambar 3. Skema uji toksisitas akut.....	35

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Klasifikasi potensi ketoksikan akut (Loomis 1978).....	14
Tabel 2. Kriteria hewan uji (BPOM 2014).....	19
Tabel 3. Hubungan tanda-tanda keracunan dengan organ beserta sistem urat saraf (Harmita & Radji 2004).....	23
Tabel 4. Hasil penetapan kelembaban serbuk daun pletekan.....	38
Tabel 5. Hasil penetapan kadar air serbuk daun pletekan.....	38
Tabel 6. Hasil persentase rendemen ekstrak daun pletekan.....	39
Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk daun pletekan.....	40
Tabel 8. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun pletekan.....	40
Tabel 9. Hasil persentase kematian hewan uji ekstrak etanol daun pletekan...	41
Tabel 10. Hasil persentase perubahan perilaku <i>grooming</i> tiap kelompok.....	42
Tabel 11. Hasil persentase perubahan perilaku menggelantung tiap kelompok	43
Tabel 12. Hasil persentase perubahan perilaku <i>retablisme</i> tiap kelompok.....	43
Tabel 13. Hasil persentase perubahan perilaku <i>straub</i> tiap kelompok.....	44
Tabel 14. Hasil persentase perubahan perilaku <i>ptosis</i> tiap kelompok.....	45
Tabel 15. Hasil persentase perubahan frekuensi <i>defekasi</i> tiap kelompok.....	46
Tabel 16. Hasil persentase perubahan frekuensi <i>urinasi</i> tiap kelompok.....	46
Tabel 17. Hasil persentase perubahan perilaku <i>writhing</i> tiap kelompok.....	47
Tabel 18. Rata-rata bobot organ mencit.....	48

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil detemiasasi daun pletekan.....	55
Lampiran 2. Sertifikasi hewan uji .....	56
Lampiran 3. Gambar daun pletekan ( <i>Ruellia tuberosa</i> L.) .....	57
Lampiran 4. Perhitungan penetapan kadar air serbuk daun pletekan .....	58
Lampiran 5. Skema pembuatan ekstrak daun pletekan.....	60
Lampiran 6. Hasil rendemen pengeringan daun pletekan.....	61
Lampiran 7. Hasil rendemen ekstrak daun pletekan .....	62
Lampiran 8. Hasil identifikasi kandungan kimia daun pletekan.....	63
Lampiran 9. Skema kerja uji toksisitas .....	64
Lampiran 10. Perhitungan pembuatan larutan stok dan dosis uji .....	65
Lampiran 11. Foto perlakuan hewan uji .....	69
Lampiran 12. Pengamatan organ secara makroskopis .....	70
Lampiran 13. Alat-alat penelitian .....	71
Lampiran 14. Penimbangan berat badan mencit.....	72
Lampiran 15. Penimbangan berat organ mencit .....	73
Lampiran 16. Perhitungan indeks massa organ mencit.....	74
Lampiran 17. Hasil uji statistik berat badan mencit.....	76
Lampiran 18. Hasil uji statistik indeks organ mencit.....	78
Lampiran 19. Tabel pengamatan perilaku hewan uji kelompok I (CMC 0,5%)....	82
Lampiran 20. Tabel pengamatan perilaku hewan uji kelompok II (5 mg/kg BB tikus) .....	84
Lampiran 21. Tabel pengamatan perilaku hewan uji kelompok III (50 mg/kg BB tikus) .....	86

Lampiran 22. Tabel pengamatan perilaku hewan uji kelompok IV (300 mg/kg BB tikus) .....	88
Lampiran 23. Tabel pengamatan perilaku hewan uji kelompok V (2000 mg/kg BB tikus).....	90
Lampiran 24. Tabel pengamatan perilaku hewan uji kelompok VI (5000 mg/kg BB tikus).....	92

## INTISARI

**ASTUTI, N., 2017, UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL DAUN PLETEKAN (*Ruellia tuberosa* L.) PADA MENCIT BETINA (*Mus musculus*) GALUR *BALB/c*, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.**

Daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) merupakan tanaman obat tradisional yang banyak tersedia di alam yang berkhasiat sebagai obat diabetes melitus, namun belum ada penelitian untuk meneliti keamanan ekstrak daun pletekan. Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek toksisitas akut ekstrak etanol daun pletekan terhadap mencit betina.

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi dengan etanol 70%. Uji toksisitas akut dilakukan dengan metode *fixed dose* menggunakan hewan uji mencit betina sebanyak 30 ekor yang dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu kontrol negatif, dosis 5 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, 300 mg/kg BB, 2000 mg/kg BB, dan 5000 mg/kg BB. Penelitian dilakukan selama 24 jam hingga 14 hari, indeks bobot organ mencit dilakukan uji statistik dengan ANAVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji Post-Hoc.

Hasil pengamatan menunjukkan setelah pemberian ekstrak sampai dosis 5000 mg/kg BB menimbulkan 1 kematian hewan uji dan efek toksik yang tidak berbeda bermakna dengan kontrol negatif, sehingga dapat dinyatakan aman. Dengan demikian LD<sub>50</sub> ekstrak etanol daun pletekan pada mencit lebih besar dari 5000 mg/kg BB termasuk klasifikasi praktis tidak toksik.

---

**Kata kunci** : Toksisitas akut, *Ruellia tuberosa* L., dan metode *fixed dose*.

## ABSTRACT

**ASTUTI, N. 2017. ACUTE TOXICITY TEST OF ETANOLIC EXTRACT PLETEKAN LEAF (*Ruellia tuberosa* L.) IN FEMALE MICE (*Mus musculus*) BALB/c STRAIN, SKRIPSI, PHARMACY FACULTY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.**

Pletekan leaf (*Ruellia tuberosa* L.) was traditional plants a lot of available in nature used as medicines diabetes mellitus, but there has been no research to examine the security of pletekan leaf extract. This study was aimed to know the effects of acute toxicity extract of leaves ethanol pletekan on female mice.

Extraction method used in this research was macerated method with ethanol 70%. Acute toxicity test conducted with fixed dose method using 30 female mice divided into six groups, the negative control, dose 5 mg/kg BW, 50 mg/kg BW, 300 mg/kg BW, 2000 mg/kg BW, and 5000 mg/kg BW. The observation was made during 24 hours up to 14 days, the organ weights of mice were analyzed using one way ANOVA and continued with Post-Hoc.

The result showed after the administration to doses 5000 mg/kg BW only cause 1 death of animal test and toxic effects that did not differ significantly with negative controls, so that leaves can be declared safe. Thereby LD<sub>50</sub> extract of leaves ethanol pletekan in mice greater than 5000 mg/kg BW included in the classification of practically not toxic.

---

**Keywords** : Acute toxicity, *Ruellia tuberosa* L., and fixed dose method.

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang Masalah**

Pengetahuan tentang khasiat dan keamanan tanaman obat di Indonesia selama ini berdasarkan pengalaman empiris diwariskan secara turun temurun dan belum teruji secara ilmiah. Penelitian tentang tanaman obat perlu dilakukan sehingga dapat digunakan dengan aman dan efektif. Uji toksisitas akut merupakan salah satu uji pra klinik untuk mengukur keamanan atau efek toksik suatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat yaitu 24 jam setelah pemejanaan dosis tunggal. Tujuan utama dilakukan uji toksisitas akut adalah untuk mendapatkan gambaran potensi toksisitas suatu zat beracun atau sediaan uji (Donatus 2005).

Penggunaan obat tradisional yang berasal dari tanaman berdasarkan keputusan menteri kesehatan RI harus memiliki syarat-syarat tertentu antara lain dapat dibuktikan khasiat dan keamanannya. Menurut keputusan menteri kesehatan RI No. 760/Menkes/Perl/IX/1992 tentang fitofarmaka (Hargono 1999). Fitofarmaka adalah sediaan obat bahan alam yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinik dan uji klinik, bahan baku dan produknya telah terstandarisasi (Anonim 2004).

Salah satu tanaman obat yang banyak ditemukan di Indonesia yaitu *Ruellia tuberosa* L. (tanaman pletekan). *Ruellia tuberosa* L. dilaporkan mengandung senyawa aktif saponin, flavonoid, alkaloid dan tanin. Hasil analisis ekstrak air daun pletekan juga mengandung serat (13,35%) dan mineral *zink* (35,5 ppm) yang merupakan antioksidan dan komponen dari berbagai enzim (Tandri 2009). Selain kandungan senyawa tersebut, daun pletekan diduga juga mengandung senyawa asing (senobiotik) yang berpengaruh terhadap sistem dan fungsi normal tubuh. Pengaruh tersebut dapat merupakan sesuatu yang diharapkan, namun dapat pula tidak diharapkan (Sugiyanto 2006). Secara eksperimen *Ruellia tuberosa* L. terbukti memiliki efek hipoglikemik, hipolipidemik dan antioksidan (Rahmi *et al* 2014; Chaitanya *et al* 2012).

Umumnya suatu bahan digolongkan menjadi dua kategori yaitu aman dan berbahaya, tergantung pada dosis dan lama pemberiannya. Bahan yang dikategorikan sebagai bahan berbahaya, tetapi bila diberikan dalam jumlah kecil dan singkat dapat saja menjadi bahan yang bermanfaat, sebaliknya juga bahan yang aman dapat menjadi bahan yang berbahaya bila diberikan dalam dosis yang besar dan dalam jangka waktu yang panjang (Loomis 1978).

Penelitian mengenai toksisitas akut dari ekstrak daun pletekan belum ada sehingga perlu diteliti lebih lanjut agar diketahui batas keamanan dari ekstrak daun pletekan untuk dapat dikonsumsi dan tidak menimbulkan efek berbahaya bagi konsumen dan diharapkan kedepannya dapat dikembangkan menjadi sebuah produk yang praktis untuk dikonsumsi oleh masyarakat.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui bahwa ekstrak daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) memiliki efek toksik yaitu ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol dengan nilai  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$  ( $453,941 \pm 0,76 \mu\text{g/mL}$  dan  $142,160 \pm 1,30 \mu\text{g/mL}$ ) dan senyawa yang bersifat toksik yaitu alkaloid, saponin, dan flavonoid (Vitalia *et al* 2016).

Toksisitas merupakan efek berbahaya dari bahan kimia atau suatu obat pada organ target. Umumnya setiap senyawa kimia mempunyai potensi terhadap timbulnya gangguan atau kematian jika diberikan kepada organisme hidup dalam jumlah yang cukup (Hayes 1983). Pada penelitian ini uji toksisitas yang dilakukan adalah salah satu dari uji toksisitas non spesifik yaitu toksisitas akut. Uji toksisitas akut adalah uji toksisitas suatu senyawa yang diberikan dalam dosis tunggal pada hewan percobaan, yang diamati selama 24 jam dan dilanjutkan selama 7-14 hari (Lu 1995).

Parameter dari uji toksisitas akut yaitu gejala-gejala klinis yang muncul, nilai  $LD_{50}$ , indeks massa organ, dan makropatologi.  $LD_{50}$  merupakan tahapan awal untuk menentukan keamanan suatu zat aktif yang akan dikonsumsi oleh manusia dengan menentukan besarnya dosis yang dapat menyebabkan kematian pada 50% populasi pengguna suatu bahan (Loomis 1978).  $LD_{50}$  ini sangat penting, erat hubungannya dengan rasio antara manfaat dan daya toksik yang dapat dinyatakan sebagai indeks terapeutik ( $LD_{50}/ED_{50}$ ), dimana makin besar indeks terapi maka

makin besar pula keamanan zat aktif tersebut (Adreanus *et al* 2002). Gejala-gejala klinis yang dapat timbul akibat zat toksik antara lain gangguan syaraf otonom, syaraf otot, perilaku, perasa, urat darah pada jantung, mata, saluran pencernaan dan kulit (Harmita & Radji 2004).

Berdasarkan latar belakang yang sudah dijelaskan peneliti tertarik untuk melakukan penelitian “uji toksisitas akut ekstrak etanol daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) pada mencit betina (*Mus musculus*) galur *BALB/c*”.

### **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang penelitian di atas, didapatkan permasalahan sebagai berikut :

Pertama, apakah klasifikasi potensi ketoksikan akut ekstrak etanol daun pletekan?

Kedua, apakah ekstrak etanol daun pletekan dengan variasi dosis 5, 50, 300, 2000 dan 5000 mg/kg BB tikus berpengaruh terhadap gejala klinis, berat badan, indeks organ dan perubahan makropatologi mencit betina?

### **C. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan, pertama, untuk mengetahui klasifikasi toksisitas ekstrak etanol daun pletekan.

Kedua, untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun pletekan dengan variasi dosis 5, 50, 300, 2000 dan 5000 mg/kg BB tikus terhadap gejala klinis, berat badan, indeks organ dan perubahan makropatologi mencit betina.

### **D. Kegunaan Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat bagi ilmu pengetahuan terutama di bidang obat tradisional yang berkaitan dengan pengembangan dan penggunaan obat tradisional khususnya tanaman secara tepat dan aman dari ekstrak etanol daun pletekan serta dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tanaman Pletekan**

##### **1. Sistematika tanaman**

Tanaman *Ruellia tuberosa* L. Secara taksonomi mempunyai klasifikasi sebagai berikut (Ditjen POM, 2009) :

Devisi : Spermatophyta  
Sub devisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledoneae  
Bangsa : Lamiales  
Suku : Acanthaceae  
Marga : Ruellia  
Jenis : *Ruellia tuberosa* L. (Steenis 1978).



**Gambar 1. Tanaman pletekan**

##### **2. Nama lain tanaman pletekan**

Tanaman pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) di Indonesia memiliki nama ceplikan, daerah Jawa lebih dikenal dengan nama pletekan (Steenis 1978).

##### **3. Morfologi tanaman pletekan**

Morfologi menurut tanaman (*Ruellia tuberosa* L.) tanaman semusim, tinggi 0,4-0,9 m. Batangnya tegak, pangkal sedikit berbaring, bersegi, hijau.

Daunnya tunggal, bersilang berhadapan, bentuk solet, ujung membulat, pangkal runcing, tepi bersegi, panjang 6-13 cm, lebar 3,5-7,5 cm, licin, pertulangan menyirip hijau. Bunganya majemuk, bentuk payung, diketiak daun, terdiri 1-15 bunga, kelopak 2-3 cm, benang sari melekat pada tabung mahkota berjumlah 4, dasar mahkota membentuk tabung, ujung berlekuk 5, panjang 3,5-5 cm, ungu. Tangkai sari berletakan berpasangan pada pangkalnya. Buahnya kotak, lonjong, kering, berbiji banyak, panjang 2-3 cm, membuka dengan dua katup, hijau. Bijinya bulat, kecil, coklat dan biji tiap ruang 2-20. Akarnya Tunggang, membentuk umbi, coklat (Steenis 1978).

#### **4. Kegunaan di masyarakat**

*Ruellia tuberosa* L. merupakan salah satu tumbuhan yang digunakan masyarakat untuk mengobati diabetes mellitus (Rahmi *et al* 2014). Daun pletekan juga berkhasiat untuk mengobati kencing batu, penurunan kadar kolesterol dan antioksidan (Chaitanya *et al* 2012).

Berdasarkan penggunaan dan pemanfaatan sebagai bahan obat tanaman bagian yang sering digunakan adalah daun pletekan sehingga dalam penelitian ini bagian tanaman yang digunakan adalah daun (Shahwar 2011).

#### **5. Kandungan kimia**

Tanaman mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, dan polifenol. Senyawa tersebut terkandung pada daun, batang dan akar (Shahwar 2011).

**5.1. Alkaloid.** Alkaloid merupakan suatu basa yang mengandung nitrogen dalam cincin heterosiklik. Alkaloid pada tumbuhan biasanya dalam bentuk garam sebagai asam organik (Robinson 1995). Alkaloid dapat ditemukan pada biji, daun, ranting dan kulit kayu dari tumbuh-tumbuhan. Kadar alkaloid dari tumbuhan dapat mencapai 10-15%. Alkaloid kebanyakan bersifat racun, tetapi ada pula yang sangat berguna dalam pengobatan. Alkaloid merupakan senyawa tanpa warna, sering kali bersifat optik aktif, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotin) pada suhu kamar (Sabirin *et al* 1994).

**5.2. Flavonoid.** Flavonoid adalah kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam terutama pada jaringan tumbuhan tinggi. Senyawa ini merupakan produk metabolik sekunder yang terjadi dari sel dan terakumulasi dari tubuh tumbuhan sebagai zat racun (Robinson 1991). Flavonoid terdiri dari cincin

benzen tersubstitusi yang disambung dengan rantai alifatik tiga karbon. Menurut Markham (1982), flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai gugus hidroksil yang tak tersulih, atau suatu gula, sehingga flavonoid cukup larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol dan air.

**5.3. Saponin.** Saponin dalam bahasa latin *sapo* yang berarti sabun adalah senyawa aktif permukaan yang kuat yang dapat menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis darah merah. Dari segi pemanfaatan, saponin sangat ekonomis sebagai bahan baku pembuatan hormon steroid, tetapi saponin kadang-kadang dapat menyebabkan keracunan pada ternak (Robinson 1995).

**5.4. Tanin.** Tanin adalah senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada beberapa tanaman. Tanin mampu mengikat protein, sehingga protein pada tanaman dapat resisten terhadap degradasi oleh enzim protease (Kondo *et al.* 2004). Tanin merupakan senyawa kimia yang tergolong dalam senyawa polifenol (Deaville *et al.* 2010). Tanin alami larut dalam air dan memberikan warna pada air, warna larutan tanin bervariasi dari warna terang sampai warna merah gelap atau coklat, karena setiap tanin memiliki warna yang khas tergantung sumbernya (Ahadi 2003).

## **B. Simplisia**

### **1. Pengertian simplisia**

Simplisia adalah bahan alami yang dapat digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga kecuali dinyatakan lain (Depkes 1995). Istilah simplisia dipakai untuk menyebutkan bahan-bahan obat alam yang masih berada dalam wujud aslinya atau belum mengalami perubahan (Gunawan & Mulyani 2004). Berdasarkan hal tersebut simplisia dibagi menjadi tiga golongan yaitu berupa simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan atau mineral.

**1.1. Simplisia nabati.** Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, pada bagian tanaman atau eksudat tanaman. Eksudat tanaman adalah isi sel yang spontan keluar dari tanaman atau isi sel dengan cara tertentu

dikeluarkan dari selnya atau zat nabati lainnya dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya dan belum berupa zat kimia murni (Depkes 1995).

**1.2. Simplisia hewani.** Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni (Depkes 1995).

**1.3. Simplisia pelikan atau mineral.** Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia yang berupa bahan-bahan pelikan (mineral) yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Depkes 1995). Misalnya adalah serbuk seng dan serbuk tembaga (Gunawan & Mulyani 2004).

## **2. Pengumpulan**

Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia nabati yang menggunakan daun. Daun dipanen kemudian dipilih daun yang tidak terlalu tua dan juga tidak terlalu muda karena daun yang terlalu tua kandungan senyawanya sebagian sudah hilang dan yang terlalu muda kandungan senyawanya belum lengkap.

## **3. Pengeringan**

Pengeringan simplisia bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama, dan untuk mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik untuk mencegah penurunan mutu atau perusakan simplisia. Pengeringan simplisia dapat dilakukan dengan menggunakan sinar matahari atau menggunakan suatu alat pengering. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam proses pengeringan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara, waktu pengeringan, dan luas permukaan bahan (Depkes 1995).

Proses pengeringan pada simplisia bertujuan untuk menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang dapat menguraikan lebih lanjut kandungan aktif yang terdapat pada bahan, memudahkan dalam hal pengelolaan proses selanjutnya (ringkas, mudah disimpan, tahan lama, dan sebagainya). Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi dalam pengeringan yaitu waktu pengeringan,

suhu pengeringan, kelembaban udara, ketebalan bahan yang dikeringkan, sirkulasi udara, dan luas permukaan bahan (Gunawan & Mulyani 2004). Cara pengeringan di tempat teduh adalah dengan cara bahan disebarakan rata di atas nampan lemari atau kotak kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu yang telah ditentukan atau dengan cara meletakkan di bawah atap rumah agar terlindung dari cahaya matahari secara langsung (Gunawan & Mulyani 2004).

#### **4. Penyimpanan**

Proses penyimpanan simplisia perlu diperhatikan beberapa hal, seperti cara pengepakan, pembungkusan, dan pewadahan, persyaratan tempat gudang simplisia, cara sortasi, cara pemeriksaan mutu, serta cara pengawetannya. Penyebab utama dari kerusakan simplisia adalah air dan kelembaban. Kadar air simplisia yang disimpan perlu diperhatikan dan dijaga. Apabila kadar air pada simplisia tinggi akan mengakibatkan tumbuhnya kapang atau mikroorganisme lain yang dapat menyebabkan perubahan kimia pada senyawa aktif dan menurunnya mutu simplisia tersebut (Depkes 1985). Simplisia disimpan di tempat terlindung dari sinar matahari dan pada suhu kamar. Kelembaban udara sebaiknya diusahakan serendah mungkin untuk mencegah terjadinya penyerapan air kelembaban udara yang tinggi dapat memacu pertumbuhan mikroorganisme. Simplisia yang mudah menyerap air harus disimpan dalam wadah tertutup rapat yang berisi kapur tohor (Depkes 1995).

### **C. Penyarian**

#### **1. Pengertian penyarian**

Penyarian merupakan peristiwa pemindahan massa. Zat aktif yang berada dalam sel ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif akan berada dalam cairan penyari tersebut. Proses penyarian dipengaruhi oleh derajat kehalusan serbuk, perbedaan konsentrasi yang terdapat mulai dari pusat butir serbuk simplisia sampai ke permukaannya (Gunawan & Mulyani 2004). Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan beberapa faktor diantaranya adalah murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif yaitu hanya menarik zat yang berkhasiat yang

dikehendaki, tidak mempengaruhi zat berkhasiat, dan diperbolehkan dalam peraturan (Gunawan & Mulyani 2004).

## **2. Ekstraksi**

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan serbuk yang tersisa diperlukan sedemikian sampai memenuhi baku yang ditetapkan (Depkes 1985). Ekstraksi adalah penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan larut. Bahan mentah obat berasal dari tumbuh-tumbuhan atau hewan tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan dan dikeringkan. Zat aktif dari tanaman obat yang secara umum mempunyai sifat kimia yang sama, mempunyai sifat kelarutan yang sama dan dapat diekstraksi secara simultan dengan pelarut tunggal atau campuran. Proses ekstraksi mengumpulkan zat aktif dari bahan mentah obat dan mengeluarkannya dari bahan sampingan yang tidak diperlukan. Metode ekstraksi dilakukan berdasarkan persamaan faktor sifat dari suatu bahan mentah atau simplisia yang disesuaikan dengan macam metode ekstraksi yang digunakan untuk memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna (Ansel 1989).

**2.1 Perkolasi.** Perkolasi merupakan cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi terus menerus dilakukan sampai diperoleh ekstrak. Umumnya menggunakan temperatur ruangan dan pelarut yang digunakan selalu baru (Depkes 1986).

**2.2 Refluks.** Refluks merupakan ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu, dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama 3-5 kali.

**2.3 Soxhlet.** Soxhlet merupakan ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru dengan menggunakan alat khusus, sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

**2.4 Digesti.** Digesti merupakan maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C.

**2.5 Infus.** Infus merupakan sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit. Infudasi umumnya untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati.

**2.6 Dekok.** Dekok merupakan infus pada waktu yang lebih lama  $\geq 30^\circ\text{C}$  dengan temperatur sampai titik didih air (Depkes 1986).

**2.7 Maserasi.** Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi cair padat dengan cara yang sederhana. Metode maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari. Keuntungan dari metode ini adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana, sedangkan kerugiannya adalah pengerjaan yang lama dan penyarian yang kurang sempurna (Depkes 1986).

Pada penelitian ini metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi (1:10). Serbuk dimasukkan ke dalam botol berwarna coklat kemudian direndam dengan pelarut 7.5 bagian, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya. Cairan hasil ekstraksi disaring dengan kain flanel. Ampas kemudian dicuci dengan pelarut 2.5 bagian dan dibiarkan selama 2 hari dengan pengocokan 3 kali sehari hal ini bertujuan untuk mempercepat konsentrasi bahan ekstraksi menjadi seimbang. Waktu lamanya maserasi  $\pm 5$  hari agar bahan kandungan simplisia dari sel yang rusak yang terbentuk saat penghalusan dapat larut dan bahan kandungan dalam sel masih tetap utuh. Setelah maserasi selesai dilanjutkan dengan memeras rendaman menggunakan kain peras. Cairan maserasi dan cairan yang diperoleh dari pemerasan disatukan dengan mencuci sisa perasan dengan bahan ekstraksi diberikan pada kandungan atau jumlah yang telah diperoleh. Proses pencucian tersebut dilakukan untuk memperoleh sisa bahan ekstraktif dan untuk menyeimbangkan kembali kehilangan saat penguapan yang terjadi pada penyarian dan pengepresan, dan hasil ekstraksi disimpan dalam kondisi dingin kemudian cairannya dituang dan disaring (Voigt 1994).

### 3. Pelarut

Penggunaan pelarut untuk ekstraksi harus disesuaikan dengan kelarutan dari kandungan bahan simplisia. Pelarut harus masuk ke dalam simplisia, dan membran simplisia yang kondisinya harus diubah terlebih dahulu menjadi kering dan mengkerut, sehingga bahan dapat masuk ke dalam simplisia. Stabilitas zat aktif tumbuhan merupakan sifat yang penting untuk memperoleh sediaan obat yang tepat, sehingga banyak zat aktif tumbuhan yang larut dalam air atau alkohol karena kepolarannya (Voigt 1994).

Pelarut organik jarang digunakan dalam penyarian, kecuali dalam proses penyarian tertentu. Proses penyarian menurut Farmakope Indonesia menetapkan cairan penyari adalah air, etanol, etanol-air, atau eter (Gunawan & Mulyani 2004).

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%, karena pelarut etanol 70% bersifat universal, sehingga dapat menarik hampir semua golongan senyawa pada daun pletekan. Sebab dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida saponin, glikosida flavonoid, kurkumin, mukarin, antrakuinon, steroid, damar, dan klorofil, sedangkan lemak, saponin, dan tanin hanya sedikit yang larut (Depkes 1986). Pelarut etanol 70% dapat menghasilkan suatu hasil yang optimal, dimana pengotor hanya dalam skala kecil turut dalam cairan pengekstraksi (Voigt 1994).

#### D. Uji Toksisitas

Menurut Paracelsus tidak ada suatu zat yang tidak beracun hal ini tergantung dari dosis pemaparan pada reseptornya (Wirasuta & Niruri 2007). Toksisitas adalah suatu sifat di mana zat yang jika dipaparkan terhadap organisme yang dapat memberi dampak terhadap seluruh organisme seperti hewan, bakteri atau tumbuhan dan efeknya terhadap substruktur organisme seperti sel dapat mengalami sitotoksisitas atau terhadap organ tubuh misalnya hati yang dapat berdampak hepatotoksik (Anonim 2007).

Toksikologi merupakan ilmu yang mempelajari tentang aksi berbahaya zat kimia atas mekanisme biologi. Tujuan akhir dari uji toksikologi adalah untuk menilai keamanan suatu zat pada suatu organisme umumnya manusia, tetapi

karena adanya kode etik maka biasanya dilakukan pada hewan atau kultur sel yang akan dikonversikan ke manusia (Hodgson *et al* 2004).

Uji toksisitas sendiri dibagi menjadi dua golongan yaitu toksisitas spesifik dan toksisitas non spesifik (Loomis 1978).

### **1. Toksisitas spesifik**

Guna mengevaluasi sifat toksik dari suatu senyawa secara lebih rinci seperti toksisitas potensi untuk mengetahui adanya toksisitas dari zat tambahan, toksisitas teratogenik yang digunakan untuk mengetahui ada efek toksik pada janin hewan uji, toksisitas reproduksi untuk mengetahui kemampuan reproduksi dari hewan uji, toksisitas mutagenik untuk mengetahui ada kelainan sistem genetik, toksisitas karsinogen untuk mengetahui potensi zat yang dapat menimbulkan tumor hingga kanker dan toksisitas kulit untuk menentukan efek lokal suatu senyawa.

### **2. Toksisitas non spesifik**

Guna mengevaluasi sifat toksik dari suatu senyawa secara keseluruhan yang terdiri dari toksisitas akut, sub kronik, dan kronik yang membedakan dari ketiganya ini adalah dari jangka waktunya.

**2.1 Toksisitas akut.** Penilaiannya secara kuantitatif didasarkan pada nilai dosis tengah yang mematikan 50% hewan uji ( $LD_{50}$ ). Toksisitas akut diperiksa melalui oral, kulit dan atau dari tempat yang terpapar tergantung pada rute bahan yang diberikan (Anonim 2007; Loomis 1978). Dilakukan dengan cara memberikan senyawa yang diuji sebanyak satu kali dan diamati selama 24 jam – 14 hari (Harmita & Radji 2004). Toksisitas akut dapat pula diukur secara kualitatif dari gejala-gejala klinis yang muncul selama percobaan.

**2.2 Toksisitas sub kronik.** Dilakukan dengan memberikan suatu senyawa dengan dosis berulang-ulang tiap harinya selama kurang lebih 10% dari masa hidup hewan uji, Prinsip dari uji toksisitas subkronis oral adalah sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis per kelompok selama 28 atau 90 hari, bila diperlukan ditambahkan kelompok satelit untuk melihat adanya efek tertunda atau efek yang bersifat *reversibel*. Tetapi peneliti biasanya menggunakan jangka waktu yang lebih pendek yaitu 14-28 hari (Harmita & Radji 2004).

**2.3 Toksisitas kronik.** Dilakukan dengan memberikan suatu senyawa secara berulang-ulang selama 3-6 bulan atau bahkan sampai seumur hidup hewan uji. Tujuan dari uji toksisitas kronis oral 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 sedemikianrupa sehingga dapat diperoleh informasi toksisitas secara umum meliputi efek neurologi, fisiologi, hematologi, biokimia klinis dan histopatologi (BPOM 2014).

#### **E. Toksisitas Akut**

Uji toksisitas akut dengan menggunakan hewan percobaan diperlukan untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian suatu zat dalam dosis tunggal atau dosis berulang yang diberikan dalam waktu tidak lebih dari 24 jam, apabila pemberian dilakukan secara berulang, maka interval waktu tidak kurang dari 3 jam (BPOM 2014).

Tujuan utama dari uji toksisitas akut adalah untuk menentukan LD<sub>50</sub>. Selain itu uji toksisitas akut dapat menunjukkan organ sasaran yang mungkin di rusak dan efek toksik spesifiknya, serta memberikan petunjuk tentang dosis yang sebaiknya digunakan dalam pengujian yang lebih lama. Prinsip dari uji ketoksikan akut yaitu pemberian secara oral suatu zat dalam beberapa tingkatan dosis kepada beberapa kelompok hewan uji, penilaian ditentukan dari kematian hewan uji sebagai parameter akhir, serta hewan yang mati dan hidup selama percobaan diotopsi untuk dievaluasi gejala toksisitas dan selanjutnya dilakukan pengamatan secara makropatologi pada setiap organ (BPOM 2014; Harmita & Radji 2004).

Parameter dari uji toksisitas akut adalah LD<sub>50</sub> yang dapat digunakan untuk mengklasifikasikan potensi ketoksikan suatu senyawa, dan gejala-gejala klinis yang timbul selama percobaan. *Lethal Dose 50%* (LD<sub>50</sub>) adalah suatu dosis senyawa yang akan menimbulkan kematian 50% hewan uji. LD<sub>50</sub> merupakan suatu harga sebenarnya yang diperoleh secara statistika. Gambaran estimasi yang paling baik dari dosis yang diperlukan untuk dapat menimbulkan kematian pada 50% hewan uji maka selalu disertai purata estimasi dari harga kesalahan, seperti

probabilitas kisaran nilainya (Loomis 1978). Penentuan probabilitas sendiri tergantung pada peneliti, terdapat beberapa metode diantaranya metode yang lazim digunakan adalah metode grafik Litchifield dan Wilcoxon, metode kertas grafik probit logaritma Miller dan Tainter, dan tata cara menemukan kisaran dari Weil (Loomis 1978).

Semakin besar nilai LD<sub>50</sub>, semakin rendah toksisitasnya begitu pula sebaliknya. Hasil yang diperoleh (dalam mg/kg BB) dapat digolongkan menurut potensi ketoksikan akut senyawa uji menjadi beberapa kelas, seperti yang terlihat pada tabel berikut (Loomis 1978).

**Tabel 1. Klasifikasi potensi ketoksikan akut (Loomis 1978).**

Kelas	LD <sub>50</sub> (mg/kg BB)
Luar Biasa toksik	1 atau kurang
Sangat Toksik	1-50
Cukup Toksik	50-500
Sdikit Toksik	500-5000
Praktis Tidak Toksik	5000-15000
Relatif Kurang Berbahaya	Lebih dari 15000

Salah satu faktor yang dapat berpengaruh dalam pengujian toksisitas akut yaitu faktor lingkungan. Faktor lingkungan tersebut diantaranya adalah tempat pemeliharaan hewan uji yang dapat mempengaruhi LD<sub>50</sub> suatu bahan kimia, suhu lingkungan yang dapat mempengaruhi efek toksik, dan tingginya kelembapan relatif yang dapat meningkatkan toksisitas akut, sehingga LD<sub>50</sub> lebih rendah (Lu 1995). Hal-hal tersebut berpengaruh pada faktor-faktor terhadap LD<sub>50</sub>, sehingga kondisi saat percobaan dilaksanakan harus dicatat dan dilaporkan (Harmita & Radji 2004).

Metode dalam menentukan nilai LD<sub>50</sub> terdiri dari banyak cara yang dapat dijabarkan sebagai berikut :

**Metode Weil, CS (Harmita & Radji 2004) :**

$$\log m = \log D + d (f + 1)$$

Keterangan :

- m = harga LD<sub>50</sub>
- D = dosis terkecil yang digunakan
- d = log r (kelipatan dosis terkecil)
- f = faktor

**Metode Farmakope Indonesia III (Depkes 1979) :**

$$m = a - b (\sum p_i - 0,5)$$

Keterangan :

m = harga LD<sub>50</sub>

a = logaritma dosis terendah yang dapat menyebabkan jumlah kematian 100% tiap kelompok

b = beda logaritma dosis yang berurutan

p<sub>i</sub> = jumlah hewan yang mati menerima dosis, i dibagi dengan jumlah hewan seluruhnya yang menerima dosis i

**Metode grafik probit (Harmita & Radji 2004)**

$$y = a + bx$$

Dimana :

y = probit 50 = 5 → 50% kematian = LD<sub>50</sub>

bx = log dosis

LD<sub>50</sub> = antilog X

Parameter selanjutnya adalah dengan melihat gejala-gejala klinis yang timbul selama masa uji pada hewan uji dimana gejala-gejala tersebut secara luas dapat berupa gangguan pada syaraf otonom, syaraf otot, perilaku, perasa, urat darah pada jantung, mata, saluran pencernaan dan kulit yang secara rinci dijelaskan pada tabel 3 (Harmita & Radji 2004).

Menentukan dosis dalam uji toksisitas akut menurut BPOM (2014) terdapat dua metode, yaitu metode konvensional, dan metode *fixed dose*. Metode konvensional merupakan metode yang menggunakan minimal 3 dosis yang berbeda. Dosis terendah adalah dosis yang tertinggi tidak menimbulkan kematian, dan dosis tertinggi adalah dosis terendah yang dapat menimbulkan kematian 100%. Apabila dosis uji telah mencapai 5000 mg/kg BB hewan uji (pada tikus) tidak menimbulkan kematian, maka uji tidak perlu dilanjutkan dengan menggunakan dosis bahan uji yang lebih tinggi. Sedangkan metode *fixed dose* adalah metode yang menggunakan dosis bertingkat antara lain 5, 50, 300, 2000

mg/kg BB hewan uji (dosis dapat ditambah hingga 5000 mg/kg BB hewan uji) (BPOM 2014).

## **F. Organ Sasaran**

Pada pemeriksaan pasca mati, dilakukan pada semua hewan yang mati, dan beberapa hewan yang hidup, terutama hewan yang tampak sakit pada akhir percobaan, hal ini dilihat secara makroskopis dengan menimbang berat organ. Penimbangan berat organ dilakukan untuk mengetahui bila kematian tidak segera terjadi setelah pemberian zat kimia, serta berat organ juga merupakan salah satu indikator yang berguna untuk toksisitas. Organ yang biasa ditimbang adalah hati, ginjal, jantung, lambung, paru-paru (Lu 1995).

### **1. Hati**

Hati merupakan kelenjar terbesar dalam tubuh, yang memiliki berat rata-rata sekitar 1500 gram atau 2,5% berat badan pada orang dewasa normal. Secara anatomi, hati terletak di tulang rusuk ke tiga anterior di dalam rongga abdominal. Bagian anterior pada permukaan hati dibatasi oleh perut dan duodenum (Green 1996).

Hati berfungsi penting untuk mempertahankan hidup dan berperan hampir di setiap fungsi metabolik tubuh. Fungsi utama hati adalah pembentukan dan ekskresi empedu yang meliputi metabolisme garam empedu, dan metabolisme pigmen empedu. Selain itu hati juga berperan penting dalam metabolisme karbohidrat, protein, lemak, penyimpanan vitamin dan mineral, metabolisme steroid, dan detoksifikasi (Price & Wilson 2006). Pemeriksaan hati dapat dilakukan secara makroskopik, yaitu dengan melihat warna dan penampilan, seperti perlemakan hati atau sirosis, dan berat organ merupakan salah satu kriteria paling peka untuk toksisitas (Lu 1995).

### **2. Jantung**

Jantung berfungsi sebagai pompa yang mengalirkan darah ke jaringan. Jantung memiliki empat ruangan utama yaitu atrium kiri, dan atrium kanan serta ventrikel kiri, dan kanan. Atrium kanan berfungsi sebagai tempat penyimpanan darah dan sebagai tempat penyalur darah dari vena-vena sirkulasi sitemik ke

dalam ventrikel kanan, dan kemudian ke paru-paru. Atrium kiri berfungsi untuk menerima darah yang mengandung oksigen dari paru-paru melalui keempat vena pulmonalis. Ventrikel kanan menghasilkan kontraksi bertekanan rendah yang cukup untuk mengalirkan darah ke dalam arteria pulmonalis. Ventrikel kiri menghasilkan tekanan yang cukup tinggi untuk mengatasi tahanan sirkulasi sistemik, dan mempertahankan aliran darah ke jaringan-jaringan perifer (Price & Wilson 2006).

### **3. Ginjal**

Ginjal merupakan organ vital yang berperan penting dalam mempertahankan kestabilan lingkungan dalam tubuh. Ginjal mengatur keseimbangan cairan tubuh, elektrolit, dan asam basa dengan cara filtrasi darah, reabsorpsi selektif air, elektrolit, dan non elektrolit, serta mengekskresi kelebihan sebagai urin. Ginjal juga mengeluarkan sampah metabolisme (seperti urea, kreatinin, dan asam urat) dan zat kimia asing, mengekskresi renin (untuk mengatur tekanan darah), mengsekresi bentuk aktif vitamin D (untuk mengatur kalsium), serta mengsekresi eritroprotein (untuk sintesis eritrosit) (Price & Wilson 2006). Pemeriksaan ginjal dapat dilakukan secara makroskopik yaitu dengan cara menimbang berat ginjal dan ditentukan pada akhir penelitian toksisitas akut dan subkronis. Perbedaan berat ginjal hewan uji dengan berat ginjal hewan pembanding akan menunjukkan lesi ginjal (Lu 1995).

### **4. Lambung**

Secara anatomis lambung terletak pada oblik kiri ke kanan menyilang di abdomen atas tepat di bawah diafragma. Lambung terbagi atas *fundus*, *korpus*, dan *antrum pilorikum* atau *pilorus*. Lambung terdiri dari empat lapisan yaitu *tunika serosa* atau lapisan luar, muskularis, submukosa, mukosa (Price & Wilson 2006).

*Tunika serosa* atau lapisan luar merupakan bagian peritoneum viseralis. Dua lapisan peritoneum viseralis menyatu pada kurvatura minor lambung dan duodenum dan terus memanjang ke hati membentuk *omentum minus* (Price & Wilson 2006).

Muskularis yang tersusun dari tiga lapis yaitu lapisan longitudinal di bagian luar, lapisan sirkulasi di bagian tengah, dan lapisan oblik di bagian dalam. Berbagai macam kombinasi susunan serabut otot akan berkontraksi untuk memecah makanan dengan cairan lambung, kemudian mendorong ke arah duodenum (Price & Wilson 2006).

Submukosa tersusun atas jaringan areolar longgar yang menghubungkan lapisan mukosa dan lapisan muskularis. Jaringan ini memungkinkan mukosa bergerak dengan gerakan peristaltic. Mukosa merupakan bagian dalam lambung yang tersusun dari lipatan-lipatan longitudinal yang disebut *rugae*, sehingga memungkinkan terjadi distensi lambung saat diisi makanan (Price & Wilson 2006).

## **5. Paru-paru**

Paru-paru terletak pada rongga dada, berbentuk kerucut yang ujungnya berada di atas tulang iga pertama dan dasarnya berada pada diafragma. Paru terbagi menjadi dua yaitu, paru kanan dan paru kiri. Paru-paru kanan mempunyai tiga lobus sedangkan paru-paru kiri mempunyai dua lobus. Kelima lobus tersebut dapat terlihat dengan jelas. Setiap paru-paru terbagi lagi menjadi beberapa subbagian menjadi sekitar sepuluh unit terkecil yang disebut *bronchopulmonary segments*. Paru-paru kanan dan kiri dipisahkan oleh ruang yang disebut mediastinum (Sherwood 2001).

Paru-paru dibungkus oleh selaput tipis yaitu pleura. Pleura terbagi menjadi pleura viseralis dan pleura parietal. Pleura viseralis yaitu selaput yang langsung membungkus paru, sedangkan pleura parietal yaitu selaput yang menempel pada rongga dada. Diantara kedua pleura terdapat rongga yang disebut kavum pleura (Guyton 2007).

## **6. Usus**

Usus halus merupakan tabung kompleks, berlipat-lipat yang membentang dari pilorus sampai katup ileosekal. Usus halus dibagi menjadi *duodenum*, *jejenum*, dan *ileum*. Masuknya kimus ke dalam usus halus diatur oleh sfingter pylorus, sedangkan pengeluaran zat yang telah dicernakan ke dalam usus besar

diatur oleh katup ileosekal. Katup ileosekal juga mencegah refluks isi usus besar ke dalam usus halus (Price 1994).

Dinding usus halus terdiri dari 4 lapisan dasar. Bagian paling luar atau serosa dibentuk oleh peritoneum. Peritoneum mempunyai lapisan visceral dan parietal, dan ruang yang terletak di antara lapisan-lapisan ini dinamakan rongga peritoneum (Price 1994).

Otot yang meliputi usus halus mempunyai dua lapisan: lapisan luar terdiri atas serabut-serabut longitudinal yang lebih tipis, dan lapisan dalam berupa serabut-serabut sirkular. Penataan demikian membantu gerakan peristaltik usus halus. Lapisan submukosa terdiri atas jaringan penyambung, sedangkan lapisan mukosa bagian dalam tebal, banyak mengandung pembuluh darah dan kelenjar (Price 1994).

### G. Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan oleh peneliti adalah mencit betina galur *BALB/c* berumur 6-8 minggu dengan bobot 20-35 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor mencit.

Pada prinsipnya jenis hewan yang digunakan untuk uji toksisitas harus dipertimbangkan berdasarkan sensitivitas, metabolisme sediaan uji yang serupa dengan manusia, kecepatan tumbuh serta mudah tidaknya cara penanganan sewaktu dilakukan percobaan. Hewan pengerat merupakan jenis hewan yang memenuhi persyaratan tersebut diatas, sehingga paling banyak digunakan pada uji toksisitas. Hewan yang digunakan harus sehat, asal, jenis dan galur, jenis kelamin, usia, serta berat badan harus jelas. Biasanya digunakan hewan muda dewasa, dengan variasi bobot tidak lebih dari 20%. Kriteria hewan uji yang digunakan dapat dilihat pada tabel 2 (BPOM 2014)

**Tabel 2. Kriteria hewan uji (BPOM 2014)**

No	Jenis hewan	Bobot	Rentang umur
1	Mencit	20 g	6-8 minggu
2	Tikus	120 g	6-8 minggu
3	Marmut	250 g	4-5 minggu
4	Kelinci	1800 g	8-9 bulan

### 1. Sistematika mencit

Sistematika mencit (*Mus musculus*) menurut Akbar (2010) adalah sebagai berikut:

Phylum	: Chordota
Sub phylum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muidae
Genus	: Mus
Species	: <i>Mus musculus</i>

### 2. Karakteristik utama mencit

Mencit merupakan hewan mamalia pengerat (rodensia) yang berkembang biak dengan cepat, mudah dipelihara dalam jumlah banyak, variasi genetiknya cukup besar. Mencit (*Mus musculus*) memiliki tubuh yang kecil, berwarna putih, dan memiliki siklus estrus teratur antara 4-5 hari. Kondisi ruang pemeliharaan harus dijaga suhunya berkisar 18-19°C dengan kelembaban udara antara 30-70%.

Mencit betina dewasa dengan umur 35-60 hari memiliki berat berkisar 18-35 gram dengan lama hidup 1-2 tahun. Masa reproduksi mencit betina berlangsung satu setengah tahun. Mencit sering digunakan dalam penelitian dengan mempertimbangkan beberapa keuntungan yang dimiliki mencit yaitu daur estrusnya teratur dapat diprediksi, periode kehamilan relatif singkat, dan mempunyai banyak anak (Akbar 2010).

Pada penelitian ini hewan uji yang digunakan adalah mencit betina galur *BALB/c* karena sedikit lebih sensitif dibandingkan mencit jantan. Sehingga sangat cocok untuk menggunakan mencit betina dalam uji toksisitas, tetapi apabila bahan uji (menurut literatur) secara toksikologi menunjukkan bahwa mencit jantan lebih sensitif, maka jenis kelamin jantan digunakan untuk uji. Secara prinsip jika hewan jantan digunakan maka diperlukan alasan yang kuat (BPOM 2014).

### 3. Kondisi ruang dan pemeliharaan hewan uji

Ruangan yang digunakan sebaiknya memiliki suhu kamar sekitar 22°C, dengan kelembaban relatif 30-70%, penerangan 12 jam terang 12 jam gelap,

ruangan harus bersih, untuk mencit memiliki luas kandang 77,4 cm<sup>2</sup>, tinggi 12,7 cm<sup>2</sup> (BPOM 2014).

#### **4. Pengambilan dan pemegangan**

Mencit ditempatkan di kandang yang bersih dan kering, pada saat pemberian bahan uji penutup kandang dibuka kemudian pegang ekor mencit dengan tangan kanan mencit diletakkan pada tempat yang tidak licin seperti kawat penutup kandang, jangan sampai mencit stress dengan cara mengelus-elus tengkuk mencit dengan tangan kita dan ekor mencit dengan jari kelingking tangan kiri dan balikkan mencit sehingga menghadap ke penguji (Harmita & Radji 2004).

#### **5. Perlakuan oral**

Pertama-tama *sputit* diisi dengan sediaan uji dengan volume yang sudah ditentukan, kemudian pegang mencit dan masukkan ujung kanul sampai rongga telak lalu berikan sediaan uji tersebut secara perlahan agar tidak tumpah-tumpah. Ditunggu beberapa detik agar sediaan uji masuk semua ke dalam saluran pencernaan baru mencit boleh dibalik dan dikembalikan ke kandangnya.

#### **6. Pengamatan gejala hewan percobaan**

Hewan percobaan yang telah diberi perlakuan diamati gejala-gejala klinis yang timbul selama 24 jam dan pengamatan kematian dilanjutkan sampai hari ke-14. Penelitian akan mengamati gejala-gejala tertentu yang mudah teramati pada saat pengujian yang dijabarkan sebagai berikut :

**6.1 Perubahan perilaku (*behavioral profile*).** Uji *grooming* yaitu melihat kebiasaan mencit menjilat tubuhnya bila frekuensi meningkat menunjukkan adanya stimulasi SSP atau saraf simpatik dan bila terjadi penurunan adanya depresi, gerakan spontan (*spontaneous activity*) terjadi bila mencit bergerak dengan cepat dan berlari adanya stimulasi SSP atau ganglia atau neuromuscular dan bila mencit sampai tertidur adanya depresi SSP, reaksi sentuh (*touch respon*) apabila mencit disentuh dengan pensil bila mencit tidak merespon menunjukkan adanya anastesia dan reaksi sakit (*pain respon*) yaitu saat ekor mencit dijepit sampai mencit bila tidak merespon menunjukkan adanya analgesik sedasi atau depresi mental.

**6.2 Perubahan pada *neurological profile*.** Perubahan pada *central excitasi* yang terdiri dari penilaian respon ketegangan (*straub respon*) terlihat pada ekor yang tegang terlihat kaku dan tegak lurus dengan lantai karena stimulasi SSP khususnya sum-sum tulang belakang, gemetar (*tremor*), kejang (*konvulsion*). Perubahan pada *motor incoordinator* yang terdiri dari penilaian gejala *abduksi* yang dapat terlihat dari kaki hewan uji yang terbuka menunjukkan adanya depresi SSP atau fungsi neuromuskular, sempoyongan (*ataksia*) yang terlihat dari cara berjalan mencit, dan reaksi refleks (*righting refleks*) yaitu kemampuan mencit untuk membalikkan diri apabila mencit diletakkan terlentang di lantai. Perubahan pada refleks hewan uji dapat berupa pina reflek yaitu gerakan menghindari rangsangan pada telinga, reflek kornea yaitu gerakan menghindari rangsangan mekanis pada kornea mata, dan reflek epsilateral jika bantalan jari kaki yang dipijat dengan pinset maka terlihat usaha melipatnya jari kaki mencit.

**6.3 Perubahan pada *autonomic profile*.** Perubahan alat optik (*Optical sign*) seperti perbesaran pupil dimana lebarnya pupil atau biasa disebut midriasis dan jika terjadi penyempitan disebut miosis, perubahan posisi palpebra dilihat dari kelopak mata yang terbuka atau tidak jika mengecil berarti adanya efek sedasi bila sebaliknya adanya efek rangsangan simpatik, dan terjadinya *eksoptalmus* karena adanya tanda efek stimulasi simpatik. Perubahan pada sistem sekresi berupa *urinasi* yaitu pengeluaran air seni yang berlebihan, *salivasi* pengeluaran air liur yang berlebihan dan *lakrimasi* pengeluaran air mata yang berlebihan. Perubahan gejala umum seperti, menggeliat: tanda bahwa terjadinya iritasi peritoneal, piloreksi, perubahan warna kulit menjadi pucat.

**Tabel 3. Hubungan tanda-tanda keracunan dengan organ beserta sistem urat saraf (Harmita & Radji 2004).**

Sistem	Tanda-tanda ketoksikan
Syaraf otonom	<i>Exophthalmus</i> (mata merah), hidung berlendir, liur keluar, mencret, sering kencing, piloereksi dan <i>relaxed nictating membrane</i> .
Perilaku	Kurang tenang, gelisah, posisi duduk kepala mendongak, memandang kosong ke depan, kepala menunduk, depresi berat, kaki menggaruk-garuk, terengah-engah, mudah terganggu, sikap bermusuhan agresif maupun defensif, ketakutan, bingung, aktivitas aneh.
Perasa / sensory	Sensitif terhadap rasa sakit, <i>righting</i> , kornea labirin (rongga telinga), refleks setempat dan kiki belakang, sensitif terhadap suara dan sentuhan, nigtamus, <i>ponation</i> .
Syarat otot	Aktivitas meningkat atau menurun, <i>fasciculation</i> , gemetar, kejang-kejang, tidak bisa digerakkan, <i>prostation</i> , ekor membengkok ke bawah kemuka, kaki belakang lemah, refleks jelek <i>ophisthonus</i> , kedutan, kematian.
Urat darah jantung	Detak jantung naik atau turun, sianosis, penyumbatan/ gangguan urat darah jantung, pelebaran urat jantung, pelebaran urat darah jantung, pendarahan.
Respiratory / pernafasan	<i>Hypopnea</i> , <i>dyspenia</i> , megap-megap, <i>apnea</i> .
Ocular / mata	Midriasis, misis, lakrimasi, ptosis, nistagmus, siklopedia, <i>pupillary light refleks</i> .
Gastrointestinal/ gastrourinary	Air liur keluar terus, mencret, kotoran dan air seni berdarah, sembelit, <i>rhinorrhea</i> , kencing dan buang air besar tidak terkontrol.
Cutaneous / kulit	Alopesia, piloereksi, gemetar seperti anjing, badannya basah, eritema, edema, nekrosis (bercak-bercak), bengkak.

## 7. Mengorbankan hewan uji

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

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

Teknik mengorbankan hewan uji ada beberapa cara yaitu cara dislokasi leher untuk hewan kecil seperti mencit, tikus, cara anestesi secara inhalasi atau penyuntikan, cara pengeluaran darah melalui vena jugularis atau arteri karotis (BPOM 2014).

## H. Landasan Teori

Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa ekstrak daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) memiliki efek hipoglikemik, hipolipidemik dan antioksidan (Rahmi *et al* 2014; Chaitanya *et al* 2012). Daun pletekan juga banyak digunakan di masyarakat sebagai antidiabetes.

Idealnya untuk mengembangkan suatu produk obat yang praktis, memiliki potensi yang baik dan lebih aman dibandingkan obat berbahan kimia perlu dilakukan serangkaian pengujian. Banyaknya penggunaan obat antidiabetes pada masyarakat sekarang ini merupakan suatu peluang bagi peneliti untuk meneliti lebih aman lagi tentang keamanan obat tradisional daun pletekan tersebut sehingga dapat dikonsumsi dan tidak menimbulkan efek berbahaya bagi konsumennya dan diharapkan ke depannya dapat dikembangkan menjadi sebuah produk yang praktis untuk dikonsumsi oleh pasien.

Toksikitas akut adalah perkiraan potensi bahaya suatu zat pada manusia maupun hewan. Parameter untuk menentukan dosis yang dapat menyebabkan ketoksikan akut adalah LD<sub>50</sub> yaitu dosis yang dapat menyebabkan kematian pada 50% hewan uji, gejala-gejala klinis yang timbul akibat penggunaan ekstrak tersebut, perubahan secara makropatologi, indeks organ, dan berat badan. Uji toksikitas akut dapat dilakukan sebagai langkah awal untuk mengetahui adanya sifat toksik yang dapat timbul dengan cepat pada penggunaan ekstrak daun pletekan ini.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui bahwa ekstrak daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) memiliki efek toksik yaitu ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol dengan nilai LC<sub>50</sub> < 1000 µg/mL (453,941 ± 0,76 µg/mL dan 142,160 ± 1,30 µg/mL) dan senyawa yang bersifat toksik yaitu alkaloid saponin, dan flavonoid (Vitalia *et al* 2016).

Prinsip dari toksisitas akut ini yaitu dilakukan pada hewan percobaan sehat diberikan ekstrak daun pletekan secara oral dengan dosis yang dapat menyebabkan kematian 50% kelompok hewan uji mati pada sekali pemberian dan diberi kelompok kontrol negatif yang tidak diberikan sediaan uji. Dilakukan pengamatan pada setiap gejala klinis yang timbul setelah perlakuan dan pencatatan jumlah hewan uji yang mengalami kematian akibat suatu zat yang dipejankan dan biasanya dinyatakan dalam LD<sub>50</sub>, kemudian dosis tersebut dapat diklasifikasikan untuk menentukan peringkat letalitasnya.

### **I. Hipotesis**

Berdasarkan uraian di atas, maka dapat disusun suatu hipotesis dalam penelitian ini, yaitu pertama, klasifikasi potensi ketoksikan akut ekstrak etanol daun pletekan dengan dosis lebih dari 5000 mg/kg BB tikus termasuk dalam klasifikasi praktis tidak toksik.

Kedua, ekstrak daun pletekan dengan variasi dosis 5, 50, 300, 2000 dan 5000 mg/kg BB tikus berpengaruh terhadap gejala klinis, berat badan, indeks organ dan perubahan makropatologi mencit betina.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pletekan yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balittro) Bogor, Jawa Barat.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang dilakukan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pletekan yang diambil secara acak, dipilih yang bersih, dan segar diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balittro) Bogor, Jawa Barat.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun pletekan dalam berbagai dosis. Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah perilaku toksik pada mencit betina. Variabel ketiga dalam penelitian ini adalah hewan uji dan kondisi percobaan.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun pletekan yang diberikan pada tikus dalam berbagai variabel dosis toksik.

Variabel tergantung adalah variabel akibat dari variabel utama. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek toksisitas akut ekstrak etanol daun pletekan terhadap mencit betina dengan melihat gejala toksik, serta LD<sub>50</sub>.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah keahlian peneliti, kondisi laboratorium dan alat, kondisi fisik dari hewan uji yang meliputi berat badan, usia, lingkungan, tempat hidup, galur, dan jenis kelamin.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun pletekan adalah daun segar yang diambil dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) Bogor, Jawa Barat.

Kedua, serbuk daun pletekan adalah serbuk yang dibuat dari daun pletekan yang telah dicuci bersih, dikeringkan dalam oven dalam suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$ , diblender dan diayak dengan ayakan No 40.

Ketiga, ekstrak etanolik daun pletekan adalah hasil ekstraksi daun pletekan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak yang diperoleh diuapkan hingga kental.

Keempat, dosis ekstrak daun pletekan yang digunakan adalah metode *fix dose* yaitu 5, 50, 300, 2000, 5000 mg/kg BB tikus.

Kelima, hewan uji adalah mencit putih betina galur *BALB/c* yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keenam, efek toksik yang diamati pada mencit betina adalah gejala toksik meliputi *straub*, *piloereksi*, *ptosis*, reflek pineal, reflek korneal, lakrimasi, katalepsi, menggelayang, retablisme, fleksi, *haffner*, *grooming*, defekasi, urinasi, salivasi, vokalisasi, tremor, kejang, dan *writhing*, yaitu pada jam ke-0, 0,5, 1, 2, 4, dan 24 setelah pemberian ekstrak etanolik daun pletekan.

Ketujuh,  $\text{LD}_{50}$  adalah menentukan keamanan besarnya dosis yang dapat menyebabkan kematian pada 50% populasi setelah diberikan ekstrak daun pletekan.

Kedelapan, makropatologi adalah pengamatan makroskopik terhadap organ sasaran meliputi hati, jantung, ginjal, lambung dan paru-paru hewan uji yang dibandingkan dengan kontrol normal. Pemeriksaan makropatologi dilakukan untuk melihat pengaruh makroskopik dari pemberian ekstrak daun pletekan terhadap tikus putih betina galur wistar.

Kesembilan, klasifikasi potensi ketoksikan akut adalah penentuan kategori toksisitas akut berdasarkan  $\text{LD}_{50}$  antara lain luar biasa toksik untuk  $\text{LD}_{50}$  1 mg/kg BB atau kurang, sangat toksik untuk  $\text{LD}_{50}$  1-50 mg/kg BB, cukup toksik untuk  $\text{LD}_{50}$  50-500 mg/kg BB, sedikit toksik untuk  $\text{LD}_{50}$  500-5000 mg/kg BB, praktis tidak toksik untuk  $\text{LD}_{50}$  5000-15000 mg/kg BB, relatif kurang berbahaya untuk  $\text{LD}_{50} > 15000$  mg/kg BB.

### **C. Alat dan Bahan**

#### **1. Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi, alat yang digunakan untuk membuat simplisia yaitu oven, blender, dan ayakan no. 40, gelas piala, batang pengaduk, penangas air, kain flanel, kertas saring, corong gelas, beaker glass, corong Buchner, *vacum rotary evaporator*. Alat yang digunakan untuk perlakuan pada hewan uji antara lain adalah kandang tikus, neraca elektrik, jarum oral (kanul), *platform*, *cotton bud*, dan seperangkat alat bedah (skalpel, pinset, gunting, jarum, dan meja lilin).

#### **2. Bahan**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pletekan, mencit putih betina galur *BALB/c* umur 6-8 minggu, etanol 70%, dan CMC Na 0,5%.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Determinasi tanaman**

Tahap pertama penelitian ini adalah melakukan determinasi daun pletekan yang bertujuan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian sudah sesuai dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi tanaman terhadap pustaka yang dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Pusat Penelitian Biologi. Bogor, Jawa Barat.

#### **2. Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk daun pletekan**

Daun pletekan diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) Bogor, Jawa Barat. Pengambilan daun pletekan diambil dari daun yang tidak terlalu tua dan juga tidak terlalu muda dan masih segar. Daun dikumpulkan kemudian ditimbang, setelah itu dicuci bersih dengan air mengalir hingga bersih dan terbebas dari kotoran. Daun pletekan yang sudah dibersihkan di bawah air mengalir, kemudian dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 40°C sehingga didapat daun pletekan yang kering lalu ditimbang. Daun pletekan yang sudah kering dihaluskan, dibuat serbuk, dan diayak menggunakan ayakan no 40 kemudian serbuk ditimbang.

### **3. Penetapan susut pengeringan**

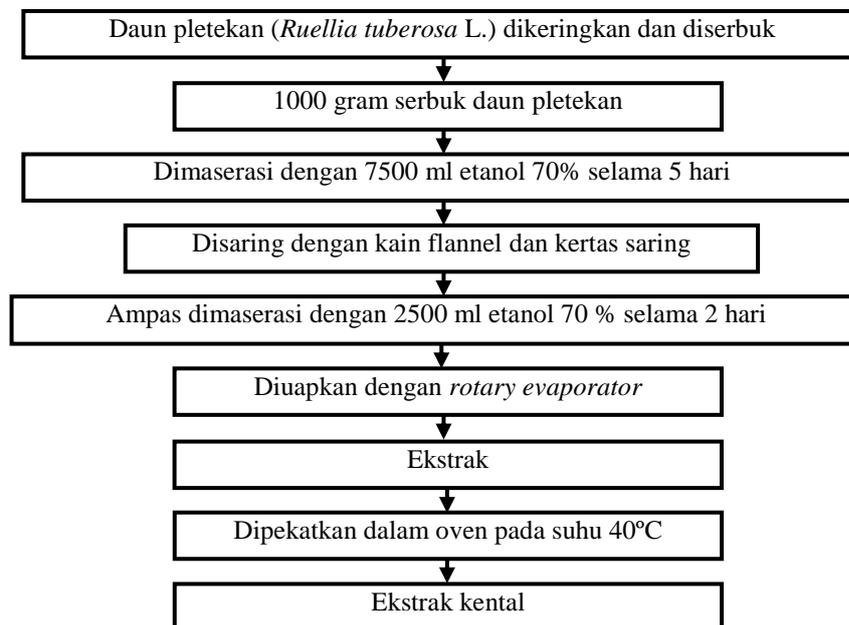
Penetapan susut pengeringan daun pletekan pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Penetapan susut pengeringan serbuk daun pletekan dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Caranya serbuk daun pletekan ditimbang sebanyak 2 gram, dimasukkan ke dalam alat *moisture balance* pada suhu 105°C dan tunggu sampai memberikan tanda atau bunyi. Angka yang muncul dalam satuan persen pada alat *moisture balance* dicatat sebagai susut pengeringan. Susut pengeringan dalam serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10% (Depkes RI 1985).

### **4. Penetapan kadar air**

Penetapan kadar air dilakukan dengan menimbang 20 gram serbuk daun pletekan kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat pada alat *Sterling-Bidwell* kemudian ditambahkan xilen sebanyak 100 ml dan dipanaskan sampai tidak ada tetesan air lagi kemudian dilihat volume tetesan tadi dan dihitung kadarnya dalam satuan persen.

### **5. Pembuatan ekstrak etanolik daun pletekan**

Pembuatan ekstrak daun pletekan dilakukan dengan metode maserasi (1:10) dimana sebanyak 1000 gram serbuk daun pletekan direndam dalam 7500 ml etanol 70% ke dalam botol maserasi. Botol maserasi kemudian ditutup rapat dan didiamkan selama 5 hari sambil diaduk 3 kali sehari. Setelah 5 hari, rendaman tersebut disaring dengan menggunakan kain flanel kemudian disaring kembali menggunakan kertas saring. Ampas kemudian dicuci kembali dengan etanol 70% sebanyak 2500 ml dan dibiarkan selama 2 hari. Kemudian filtrat tersebut diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga pelarut akan menguap dan diperoleh ekstrak dengan konsentrasi yang pekat ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara yang pecah-pecah pada permukaan ekstrak, setelah diuapkan menggunakan *rotary evaporator* kemudian ekstrak dipadatkan lagi menggunakan oven pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak daun pletekan

## 6. Pemeriksaan bebas alkohol

Pemeriksaan bebas alkohol terhadap ekstrak daun pletekan bertujuan untuk memastikan bahwa di dalam ekstrak kental yang diperoleh bebas dari alkohol dengan reaksi esterifikasi. Dilakukan dengan mencampurkan asam asetat dan asam sulfat pekat ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi ekstrak kemudian dipanaskan. Ekstrak yang sudah bebas etanol tidak tercium bau wangi harum etanol.

## 7. Identifikasi senyawa serbuk daun pletekan

Senyawa kimia yang terkandung dalam serbuk daun pletekan adalah saponin, flavonoid dan tannin. Identifikasi dilakukan dengan cara mereaksikan sampel dengan reagent-reagent tertentu. Adanya kandungan senyawa kimia akan memberi hasil yang spesifik.

**6.1. Identifikasi saponin.** Serbuk daun pletekan ditimbang 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah air panas 10 ml, didinginkan lalu dikocok kuat-kuat selama 10 menit. Reaksi positif apabila terbentuk buih yang mantap setinggi 1-10 cm, pada penambahan setetes asam klorida 2N buih tidak hilang (Depkes 1978).

**6.2. Identifikasi flavonoid.** Serbuk daun pletekan ditimbang 1 gram, dilarutkan dalam 100 ml air panas lalu dipanaskan selama 15 menit, kemudian didinginkan dan saring. Filtrat yang diperoleh disebut larutan A. Larutan A dimasukkan sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi ditambah 0,1 gram magnesium, 2 ml larutan alkohol : larutan asam klorida (1:1), 2 ml pelarut amil alkohol. Campuran dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah, reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah, kuning, jingga, pada lapisan amil alkohol (Depkes 1978).

**6.3. Identifikasi alkaloid.** Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara 2 gram serbuk daun petekan ditambah 1 ml HCl 2%, kemudian larutan dibagi menjadi tiga sama banyak dalam tabung reaksi lain. Tabung I sebagai pembanding, tabung II ditambah 2 tetes reagen *Dragendorf*, reaksi positif jika terdapat kekeruhan atau endapan coklat. Tabung reaksi III ditambah 2 tetes *Mayer*, reaksi positif jika terdapat endapan putih kekuningan (Robinson 1995).

**6.4. Identifikasi tanin.** Serbuk daun pletekan ditambah 10 ml air panas kemudian dididihkan selama 15 menit dan saring. Filtrat yang diperoleh disebut larutan B. sebanyak 5 ml larutan B ditambah pereaksi  $\text{FeCl}_3$  5%, reaksi positif jika berwarna hijau violet (Depkes 1978).

## **8. Identifikasi senyawa ekstrak etanol daun pletekan**

**8.1 Identifikasi saponin.** Identifikasi saponin dilakukan dengan cara 1 ml ekstrak daun pletekan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah 10 ml air panas dan dibiarkan menjadi dingin, setelah itu dikocok vertikal selama 10 detik. Reaksi positif jika di dalam tabung reaksi terbentuk busa yang stabil. (Depkes RI 1987).

**8.2 Identifikasi flavonoid.** Identifikasi flavonoid dilakukan dengan cara 1 ml ekstrak daun pletekan ditambah dengan 0,1 gram serbuk magnesium, ditambah 2 ml larutan alkohol : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran ini dikocok kuat-kuat dan dibiarkan memisah. Reaksi positif jika membentuk warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI 1987).

**8.3 Identifikasi alkaloid.** Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara 2 ml ekstrak daun petekan ditambah 1 ml HCl 2%, kemudian larutan dibagi menjadi

tiga sama banyak dalam tabung reaksi lain. Tabung I sebagai pembanding, tabung II ditambah 2 tetes reagen *Dragendorf*, reaksi positif jika terdapat kekeruhan atau endapan coklat. Tabung reaksi III ditambah 2 tetes *Mayer*, reaksi positif jika terdapat endapan putih kekuningan (Robinson 1995).

**8.4 Identifikasi tanin.** Identifikasi tannin dilakukan dengan cara 1 ml ekstrak daun pletekan ditambah 10 ml air dipanaskan selama 15 menit di atas penangas air, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan besi (III) klorida, diamkan beberapa saat, reaksi positif jika terbentuk warna biru kehitaman atau hijau kehitaman (Depkes RI 1987).

## 9. Penentuan dosis

Volume maksimal larutan uji yang dapat diberikan pada mencit dengan berat 20 gram adalah 1 mL.

**9.1 Dosis CMC-Na 0,5%.** Dosis CMC-Na 0,5% yang diberikan adalah sebesar 1 mL pada kelompok dosis kontrol.

**9.2 Dosis sediaan uji.** Dosis yang digunakan pada penelitian ini menggunakan metode *fix dose* yaitu dengan dosis 5, 50, 300, 2000, dan 5000 mg/kg BB tikus.

## 10. Uji efek toksisitas akut

Mencit yang telah diaklimatisasi selama kurang lebih satu minggu di dalam laboratorium ditimbang dan masing-masing diberi tanda pengenal pada ekornya. Mencit sebanyak 30 ekor yang masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor mencit. Mencit yang digunakan adalah mencit putih betina berumur 6-8 minggu dengan bobot 15-25 g yang diperoleh dari Universitas Setia Budi Surakarta.

Kelompok I : Diberi kontrol negatif CMC-Na 0,5%

Kelompok II : Diberi ekstrak etanol daun pletekan dosis 5 mg/kg BB tikus

Kelompok III : Diberi ekstrak etanol daun pletekan dosis 50 mg/kg BB tikus

Kelompok IV : Diberi ekstrak etanol daun pletekan dosis 300 mg/kg BB tikus

Kelompok V : Diberi ekstrak etanol daun pletekan dosis 2000 mg/kg BB tikus

Kelompok VI : Diberi ekstrak etanol daun pletekan dosis 5000 mg/kg BB tikus

Mencit yang telah ditimbang dan dikelompokkan kemudian diberi sediaan uji sesuai dosis yang telah ditentukan, diamati selama 24 jam gejala klinis atau perilaku yang timbul jika tidak ada kematian percobaan dilanjutkan sampai 7-14 hari kedepan untuk memperoleh data berat badan tikus.

Gejala klinis diamati dari perubahan perilaku mencit yang abnormal dari biasanya seperti *grooming* dilihat dari frekuensi kebiasaan mencit dalam menjilat tubuhnya. Gerakan spontan dilihat dari cara mencit berjalan dengan cepat, normal atau tertidur. Reaksi sentuh dilakukan dengan mencit diberi sentuhan dengan pensil dan diamati perilaku mencit merespon atau tidak merespon. *Haffner* atau reaksi sakit diamati dengan cara ekor mencit dijepit dengan pinset hingga mencit mengeluarkan suara.

Gejala klinis diamati dari perubahan sistem syaraf yang abnormal dari biasanya seperti adanya ketegangan saat mencit diletakkan di lantai dan ekornya terlihat kaku. Gemeteran dilihat dengan memegang mencit lalu diamati anggota tubuh yang terlihat bergetar. Kejang dilihat dari tubuh mencit diletakkan di atas *platform* dan terlihat menegang (kaku). *Abduksi* diamati dengan melihat perilaku mencit yang membuka kakinya saat berjalan di atas *platform*. *Ataksia* refleks dapat dilakukan dengan meletakkan mencit dengan posisi terlentang diatas *platform* kemudian dilihat kemampuan mencit untuk dapat membalikkan badannya. Pineal reflek dilakukan dengan menyentuh telinga mencit dengan *cotton bud* dan ada respon dari mencit. Reflek espiateral dengan menjepit kaki mencit dengan pinset untuk melihat respon mencit melipat jari kakinya.

Gejala klinis diamati dari perubahan sistem otonom yang abnormal dari biasanya seperti perubahan alat optik diamati adanya perbesaran atau penyempitan pupil mata. Uji posisi palbera dilihat kelopak mata mencit menutup, membuka lebar atau normal. Urinasi dilihat dengan adanya volume urine yang berlebihan sehingga setiap mencit diletakkan dalam kandang tunggal. Menggeliat dilakukan dengan perilaku mencit yang merapatkan perutnya pada lantai. Piloereksi dilihat dari bulu mencit yang berdiri ke atas. Warna kulit mencit yang berubah menjadi pucat yang seharusnya kemerahan.

Nilai LD<sub>50</sub> dihitung dengan menggunakan rumus Probit yaitu :

$$y = a + bx$$

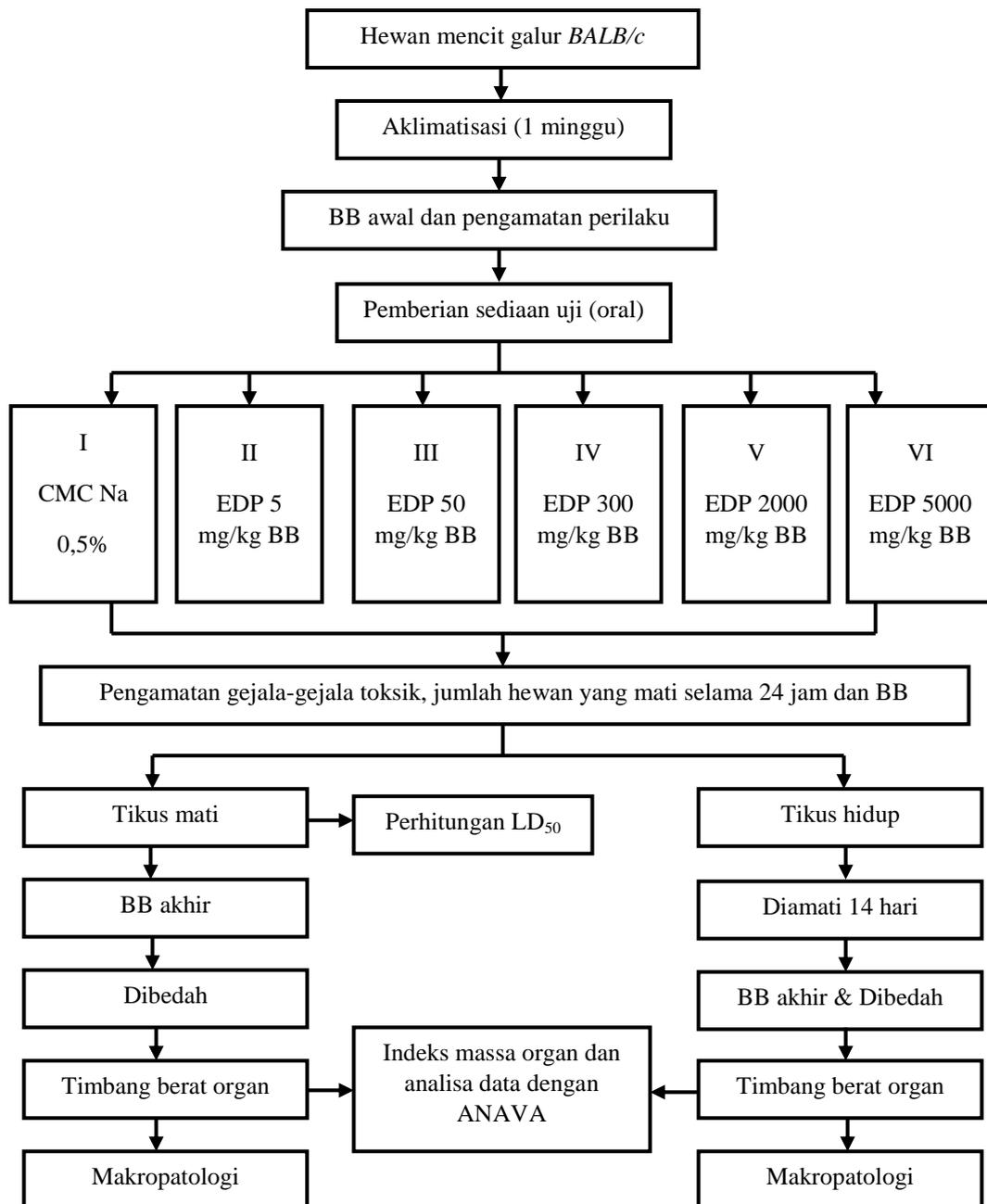
Dimana :

$$y = \text{probit } 50 = 5 \rightarrow 50\% \text{ kematian} = \text{LD}_{50}$$

$$bx = \log \text{ dosis}$$

Pengamatan dilanjutkan hingga hari ke-14. Pada hari ke-5, hari ke-10 dan hari ke-14 ditimbang lagi berat badan mencit untuk mendapatkan bobot organ. Setelah 14 hari mencit yang masih hidup dikorbankan dengan cara dislokasi leher, kemudian dibedah untuk melakukan pengamatan makropatologi organ. Pada penelitian ini organ yang diamati secara makroskopik dan bobotnya meliputi jantung, paru-paru, ginjal, lambung, hati dan usus kemudian ditimbang dan dihitung indeks massa organnya. Indeks organ tikus dapat dihitung sebagai berikut :

$$\text{Indeks organ} = \frac{\text{berat organ tikus}}{\text{berat badan tikus}}$$



Gambar 3. Skema uji toksisitas akut

### E. Analisis Hasil

Data yang diperoleh pada uji toksisitas akut adalah perubahan perilaku,  $LD_{50}$ , indeks organ, makropatologi dan berat badan. Data yang dianalisis dengan SPSS adalah data indeks organ. Sedangkan data  $LD_{50}$  dianalisis dengan rumus

yang telah ditentukan dengan metode probit. Pada hari ke-14 dilakukan pemeriksaan makropatologi pada organ hewan uji yang diberi perlakuan dan kelompok kontrol, data yang diperoleh kemudian digunakan untuk mengevaluasi ketoksikan pada organ mencit.

Data yang diperoleh dari indeks organ dianalisis dengan uji *Kolmogrov-Smirnov*, sedangkan kehomogenan varian diuji dengan uji *Levene*. Apabila  $P > 0,05$ , maka data terdistribusi normal dan homogen untuk tiap varian, dilakukan uji parametrik dengan uji *One Way Anova*, apabila data tidak terdistribusi normal maka diuji dengan non-parametrik. Jika perbedaan bermakna, dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference (LSD)* dengan taraf kepercayaan 95%. Apabila data terdistribusi tidak normal, dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan jika perbedaan bermakna dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil dan Pembahasan Pembuatan Ekstrak**

##### **1. Determinasi tanaman**

Determinasi daun pletekan dilakukan di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor pada tanggal 27 Desember 2017. Tujuan dari determinasi ini adalah untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan dengan tanaman lain yang sejenis. Berdasarkan hasil determinasi yang dilakukan, disimpulkan bahwa sampel yang dibawa adalah benar daun pletekan (*Ruellia tuberosa L.*). Hasil determinasi pada lampiran 1.

##### **2. Hasil pengambilan bahan**

Daun pletekan yang digunakan diambil dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) Bogor, Jawa Barat pada bulan November 2016 yang dilakukan secara acak. Daun pletekan yang sudah dideterminasi kemudian disortasi dengan memilih daun yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, setelah disortasi kemudian dicuci bersih untuk menghilangkan pengotor yang menempel di daun dengan air yang mengalir kemudian dianginkan agar daun tidak terlalu basah.

##### **3. Hasil pembuatan serbuk tanaman**

Daun pletekan kering digiling kemudian diayak menggunakan ayakan nomor 40 untuk menyeragamkan ukuran serbuk. Tujuan dari penyerbukan adalah untuk memperkecil ukuran daun kering sehingga luas permukaan yang kontak dengan pelarut lebih luas agar senyawa yang diekstrak lebih maksimal. Hasil penimbangan daun pletekan kering sebesar 2350 gram. Berat basah daun pletekan sebesar 20.000 gram dikeringkan dan diperoleh berat kering sebesar 2000 gram yang berarti persentase berat kering terhadap berat basah sebesar 11,75%. Perhitungan rendemen kering daun pletekan dapat dilihat pada lampiran 6.

##### **4. Hasil penetapan kelembaban serbuk tanaman**

Metode penetapan kelembaban serbuk daun pletekan dengan cara ditimbang sebanyak 2 gram menggunakan alat *moisture balance* dimaksudkan agar mutu dan khasiat daun pletekan tetap terjaga. Serbuk tanaman dipanaskan

dalam *moisture balance* hingga diperoleh kadar kelembaban. Kadar kelembaban yang tinggi dapat menyebabkan serbuk tanaman mudah ditumbuhi jamur dan bakteri akibat reaksi enzimatik. Kadar kelembaban serbuk daun pletekan dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Hasil penetapan kelembaban serbuk daun pletekan.**

Bahan	Berat awal (gram)	Kelembaban (%)
Daun pletekan	2,0	8,5
	2,0	8,0
	2,0	8,3
Rata-rata ± SD		8,27 ± 0,25

Tabel 4 menunjukkan bahwa rata-rata kadar kelembaban serbuk daun pletekan sebesar 8,27%. Kadar kelembaban serbuk daun pletekan memenuhi persyaratan kadar air dari serbuk simplisia yaitu kurang dari 10% (Depkes RI 1985).

## 5. Hasil penetapan kadar air serbuk tanaman

Penetapan kadar air menggunakan *Sterling Bidwell*. Penetapan kadar air ini bertujuan untuk mengetahui hasil dari serbuk daun pletekan yang diperoleh apakah memenuhi persyaratan atau tidak sesuai dengan standar yang ditetapkan.

**Tabel 5. Hasil penetapan kadar air serbuk daun pletekan**

Bahan	Penimbangan (gram)	Skala (ml)	Kadar (%)
Daun pletekan	20	1,60	8
	20	1,75	8,75
	20	1,70	8,5
Rata-rata ± SD			8,4 ± 0,4

Tabel 5 menunjukkan hasil penetapan kadar air serbuk daun pletekan yang ditimbang 20 gram serbuk kemudian diukur kadar airnya menggunakan *Sterling Bidwell*. Persentase rata-rata kadar air dalam serbuk daun pletekan adalah 8,4%. Hal ini menunjukkan bahwa kadar air serbuk daun pletekan telah memenuhi syarat, yaitu tidak lebih dari 10%. Apabila kadar air serbuk daun pletekan lebih dari 10% akan mudah ditumbuhi bakteri karena air merupakan media yang disukai bakteri untuk hidup dan berkembang biak. Hasil perhitungan persentase rata-rata kadar air serbuk daun pletekan terlampir pada lampiran 4.

## 6. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol daun pletekan dilakukan dengan menggunakan metode maserasi (1:10). Serbuk daun pletekan yang digunakan sebanyak 1250

gram dengan pelarut etanol 70% sebanyak 9375 L dalam botol maserasi. Maserasi dilakukan selama 5 hari dengan pengocokan 3 kali sehari. Maserat dapat diperoleh dengan dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain flannel setelah itu menggunakan kertas saring. Ampas kemudian dicuci kembali dengan etanol 70% sebanyak 3125 ml dan dibiarkan selama 2 hari. Filtrat yang diperoleh berwarna hijau pekat.

Maserat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator*. Tujuan dilakukannya pemekatan adalah untuk menghilangkan sisa pelarut yang terdapat dalam maserat. Prinsip kerja dari *rotary evaporator* ini adalah adanya penurunan tekanan sehingga pelarut dapat menguap pada suhu di bawah titik didihnya. Suhu *rotary evaporator* saat pemekatan maserat daun pletekan adalah 45°C, pemekatan ini dilakukan sampai tidak ada lagi pelarut yang menetes. Hasil pemekatan kemudian diambil lalu dimasukkan ke dalam oven hingga diperoleh ekstrak kental.

**Tabel 6. Hasil persentase rendemen ekstrak daun pletekan**

Sampel	Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Daun pletekan	1250	193,21	15,46

Tabel 6 menunjukkan persentase rendemen dari ekstrak daun pletekan sebesar 15,46% dan perhitungan dapat dilihat pada lampiran 7.

## **7. Identifikasi kandungan kimia daun pletekan**

Identifikasi kandungan kimia daun pletekan dilakukan dengan menggunakan metode tabung pada serbuk dan ekstrak etanol daun pletekan. Serbuk dan ekstrak etanol dilakukan uji kualitatif menggunakan reaksi warna untuk mengetahui kandungan saponin, flavonoid, tanin, dan alkaloid. hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol daun pletekan dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

**Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun pletekan**

Kandungan kimia	Serbuk	Ekstrak	Pustaka
Saponin	+	+	Hasil positif jika terbentuk buih yang mantap, pada penambahan setetes asam klorida 2N buih tidak hilang (Depkes 1978).
	(Terbentuk buih)	(Terbentuk buih)	
Flavonoid	+	+	Hasil positif ditunjukkan dengan warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes 1978).
	(Terbentuk warna kuning)	(Terbentuk warna kuning)	
Tanin	+	+	Hasil positif jika berwarna hijau violet setelah ditambah pereaksi $\text{FeCl}_3$ 5% (Depkes 1978).
	(Terbentuk warna hijau violet)	(Terbentuk warna hijau violet)	
Alkaloid	-	-	Hasil positif jika pada penambahan reagen <i>Dragendorf</i> terdapat kekeruhan atau endapan coklat dan pada penambahan reagen <i>Mayer</i> terdapat endapan putih kekuningan (Robinson 1995).
	(Tidak terdapat endapan coklat dan endapan putih)	(Tidak terdapat endapan coklat dan endapan putih)	

## 8. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun pletekan

Uji bebas etanol ekstrak daun pletekan ini bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak yang diperoleh tidak mengandung etanol sehingga tidak mempengaruhi uji toksisitas pada hewan uji.

**Tabel 8. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun pletekan**

Test esterifikasi	Hasil
Ekstrak daun pletekan + $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{SO}_4$ pekat → dipanaskan	Ekstrak daun pletekan tidak berbau etanol

Tabel 8 menunjukkan bahwa ekstrak daun pletekan sudah bebas dari etanol 70% yang digunakan sebagai pelarutnya sehingga ekstrak dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya

## 9. Penetapan dosis

Pembuatan sediaan uji tunggal dilakukan dengan mencampurkan sediaan uji dengan suspensi CMC-Na 0,5%. Dosis CMC-Na 0,5 % diberikan sebagai kontrol negatif untuk membandingkan dengan kelompok uji. Dosis sediaan uji yang diberikan pada hewan uji dikelompokkan menjadi 5 kelompok dosis tiap kelompok terdiri dari 5 mencit. Terdapat 5 varian dosis, yaitu dosis I 5 mg/kgBB tikus; dosis II 50 mg/kgBB tikus; dosis III 300 mg/kgBB tikus; dosis IV 2000 mg/kgBB tikus; dosis V 5000 mg/kgBB tikus dengan pemberian tunggal dan diamati gejala klinis selama 24 jam.

## B. Hasil dan Pembahasan Uji Toksisitas Akut

### 1. Hasil uji efek toksisitas akut sediaan uji ekstrak daun pletekan

Penelitian ini menggunakan mencit betina galur *BALB/c* berumur 6-8 minggu dengan berat badan 15-25 g sebanyak 30 ekor sebagai hewan uji. Uji toksisitas akut ini menggunakan mencit betina dikarenakan mencit betina lebih sensitif dibandingkan dengan tikus jantan sehingga lebih menguntungkan bila digunakan untuk uji toksisitas akut.

Mencit yang akan digunakan untuk percobaan diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari untuk beradaptasi terhadap lingkungan tempat uji. Mencit yang diaklimatisasi dikelompokkan menjadi enam kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor mencit. Sebelum perlakuan mencit dipuasakan terlebih dahulu selama 3-4 jam sehingga perut mencit dalam keadaan kosong sehingga tidak mempengaruhi pada saat proses pengamatan uji toksisitas akut. Setelah dipuasakan, hewan ditimbang dan diberikan sediaan uji, sediaan uji diberikan dalam dosis tunggal menggunakan sonde. Setelah perlakuan pakan boleh diberikan kembali setelah 1-2 jam.

Pengamatan intensif dilakukan selama 24 jam pada waktu ke 0, ½, 1, 2, 4, dan 24 jam untuk melihat gejala-gejala toksik. Pada uji toksisitas akut ini hewan uji yang tidak mengalami kematian dalam waktu 24 jam maka pengamatan dilanjutkan sampai hari ke-14. Pada kelompok dosis 5000 mg/kg BB tikus terjadi kematian dalam waktu 24 jam sebanyak 1 ekor mencit nomor 5.

**Tabel 9. Persentase kematian hewan uji ekstrak etanol daun pletekan**

No.	Kelompok	Dosis (mg/kg BB)	Jumlah hewan mati	% kematian
1.	Kontrol negatif	-	0	0
2.	Dosis I	5	0	0
3.	Dosis II	50	0	0
4.	Dosis III	300	0	0
5.	Dosis IV	2000	0	0
6.	Dosis V	5000	1	20

Tabel 9 menunjukkan hasil persentase kematian hewan uji ekstrak daun pletekan tiap kelompok dosis uji. Berdasarkan tabel di atas menunjukkan bahwa dengan pemberian sediaan tunggal secara peroral pada mencit sampai dengan dosis 5000 mg/kg BB tikus hanya menimbulkan kematian pada hewan uji sebanyak 1 ekor, sehingga nilai LD<sub>50</sub> toksisitas akut pada sediaan uji ini tidak

dapat ditentukan. Penentuan ketoksikan akut pada penelitian ini menggunakan LD<sub>50</sub> semu, yaitu nilai dosis tertinggi yang dapat diberikan pada hewan uji. Jadi nilai LD<sub>50</sub> sediaan tunggal ekstrak daun pletekan untuk hewan uji mencit lebih besar dari 5000 mg/kg BB tikus, menurut Loomis (1978) termasuk dalam klasifikasi praktis tidak toksik.

## 2. Hasil pengamatan gejala toksik

Pengamatan gejala toksik dilakukan selama 24 jam yaitu pada jam ke-0, ½, 1, 2, 4, dan 24. Pengamatan terjadinya gejala toksik pada hewan uji berupa perubahan perilaku (*behavioral profile*), perubahan pada *neurological profile*, dan perubahan pada *autonomic profile*.

**2.1 Perubahan perilaku (*behavioral profile*).** Pengamatan terhadap perubahan perilaku meliputi *grooming*, menggelantung, retablisme, fleksi, *haffner*.

**Tabel 10. Persentase jumlah yang mengalami perubahan perilaku *grooming* tiap kelompok**

Kelompok dosis	<i>Grooming</i> (%)					
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-24
Kontrol negatif (CMC)	80	40	60	40	20	60
Dosis I (5 mg/kg BB)	20	40	40	60	20	60
Dosis II (50 mg/kg BB)	60	20	60	20	80	60
Dosis III (300 mg/kg BB)	60	60	60	60	40	20
Dosis IV (2000 mg/kg BB)	40	60	60	40	40	100
Dosis V (5000 mg/kg BB)	20	60	40	0	20	60

Tabel 10 menunjukkan perubahan perilaku mencit berupa *grooming*. *Grooming* merupakan suatu kebiasaan yang wajar terjadi pada hewan, yaitu kebiasaan untuk membersihkan diri yang ditandai dengan menjilati tubuhnya. Apabila ada penurunan frekuensi *grooming* menunjukkan adanya penekanan sistem syaraf pusat atau simpatolitik, sedangkan bila terjadi peningkatan *grooming* menunjukkan adanya stimulasi system saraf pusat dan saraf simpatolitik.

*Grooming* terjadi pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan pada pemberian ekstrak etanol daun pletekan. Hasil 100% menunjukkan bahwa hewan uji tidak mengalami perubahan dalam pembersihan diri (normal). Pada beberapa hewan uji terjadi penurunan persentase, hal ini menunjukkan adanya perubahan perilaku atau kebiasaan pada hewan uji untuk membersihkan diri.

**Tabel 11. Persentase jumlah yang mengalami perubahan perilaku menggelayung tiap kelompok**

Kelompok dosis	Meggelayung (%)					
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-24
Kontrol negatif (CMC)	0	0	0	0	0	0
Dosis I (5 mg/kg BB)	0	0	20	20	20	0
Dosis II (50 mg/kg BB)	0	0	0	20	20	0
Dosis III (300 mg/kg BB)	0	0	0	0	0	0
Dosis IV (2000 mg/kg BB)	0	0	0	0	0	0
Dosis V (5000 mg/kg BB)	0	0	0	0	0	20

**Tabel 12. Persentase jumlah yang mengalami perubahan perilaku retablisme tiap kelompok**

Kelompok dosis	Retablisme (%)					
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-24
Kontrol negatif (CMC)	100	100	100	100	100	100
Dosis I (5 mg/kg BB)	100	100	80	80	80	100
Dosis II (50 mg/kg BB)	100	100	100	80	80	100
Dosis III (300 mg/kg BB)	100	100	100	100	100	100
Dosis IV (2000 mg/kg BB)	100	100	100	100	100	100
Dosis V (5000 mg/kg BB)	100	100	100	100	100	80

Uji menggelayung dan retablisme dilakukan untuk mengetahui adanya efek farmakologi sedatif dan relaksasi otot dari ekstrak etanol daun pletekan yang diberikan pada hewan uji. Mencit yang diamati dapat bergelayung dan cukup cepat untuk membalikan badan pada alat besi yang direntangkan untuk bergelayung. Apabila terdapat efek sedatif dan relaksasi otot maka hewan uji tidak dapat bergelayung dan dengan cepat akan jatuh. Pada tabel 11 hanya sedikit hewan uji yang dapat menggelayung dan hampir semua hewan uji cukup cepat untuk membalikan badan berpegangan dengan empat kaki pada alat besi yang direntangkan (retablisme).

Perubahan perilaku lain mencit yang diamati yaitu fleksi dan *haffner*. *Haffner* adalah reaksi terhadap rasa sakit pada saat ekor mencit dijepit dengan pinset. Fleksi adalah reaksi terhadap rasa sakit pada saat kaki mencit dijepit dengan pinset. Bila mencit tidak merespon terhadap rasa sakit tersebut menunjukkan bahwa sediaan yang diberikan memberikan efek analgetik. Semua kelompok termasuk kelompok kontrol negatif menunjukkan respon yang sama yaitu mencit merasakan rasa sakit saat ekor dan kaki mencit dijepit menggunakan

pinset. Hal ini mungkin disebabkan karena ekstrak etanol daun pletekan yang diberikan tidak memberikan efek analgetik.

**2.2 Perubahan pada *neurological profile*.** Pengamatan gejala klinis yang diamati adalah adanya perubahan system syaraf selama 24 jam pertama setelah pemberian sediaan uji pada semua kelompok mencit. Hal yang dinilai meliputi *straub*, reflek pineal, reflek korneal, tremor, dan kejang.

**Tabel 13. Persentase jumlah yang mengalami perubahan perilaku *straub* tiap kelompok**

Kelompok dosis	<i>Straub</i> (%)					
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-24
Kontrol negatif (CMC)	0	0	0	0	0	0
Dosis I (5 mg/kg BB)	0	20	60	20	20	20
Dosis II (50 mg/kg BB)	0	20	40	40	0	0
Dosis III (300 mg/kg BB)	0	0	20	40	20	40
Dosis IV (2000 mg/kg BB)	0	20	20	0	0	60
Dosis V (5000 mg/kg BB)	0	0	0	0	0	20

Tabel 13 menunjukkan adanya terlihat pada ekor yang tegang terlihat kaku dan tegak lurus dengan lantai karena stimulasi SSP khususnya sum-sum tulang belakang. Pada penelitian ini kelompok kontrol negatif tidak menunjukkan perubahan perilaku *straub* tetapi kelompok perlakuan dengan dosis 5 mg/kg BB sudah memberikan perubahan perilaku *straub*.

Parameter lain yang diamati pada sistem saraf mencit selain *straub* yaitu adanya tremor dan kejang. Parameter tremor yang diamati adalah pada saat mencit dalam keadaan diam maupun saat beraktifitas ada bagian dari tubuh mencit bergetar. Semua kelompok menunjukkan hasil yang negatif, tidak ada perubahan pada *central excitasi* karena stimulasi SSP saat pemberian perlakuan.

Reflek pineal dan reflek korneal diamati untuk mengetahui adanya perubahan pada refleks hewan uji. Pineal reflek yaitu respon terhadap rangsangan yang diberikan pada telinga mencit. Pada uji ini semua kelompok hewan uji yang diinduksi dengan *cotton bud* pada bagian telinga dapat merespon dengan baik. Hal ini menunjukkan bahwa mencit tidak mengalami gangguan pada SSP akibat pemberian ekstrak etanol daun pletekan.

Reflek korneal yaitu respon terhadap rangsangan yang diberikan pada kornea mencit. Semua kelompok mencit merespon dengan baik saat matanya

diinduksi dengan bulu ayam dimana mata mencit langsung menutup, hal ini menunjukkan bahwa mencit tidak mengalami gangguan pada SSP.

**2.3 Perubahan pada *autonomic profile*.** Pengamatan meliputi piloereksi, *ptosis*, lakrimasi, katalepsi, defekasi, urinasi, salivasi, vokalisasi, dan *writhing*. Pengamatan piloereksi pada mencit dan tikus dilakukan untuk mengetahui adanya aktivitas simpatomimetik pada sediaan dosis yang diberikan karena terjadi kompensasi terhadap suhu rendah atau menunjukkan aktivitas simpatomimetik. Piloereksi ditandai dengan berdirinya bulu-bulu di bagian tubuh mencit yang disebabkan adanya reaksi sensitivitas terhadap sentuhan, aktivitas spontan karena stimulasi system saraf pusat atau ganglia neuromuscular. Pada penelitian ini semua kelompok hewan uji tidak ada yang mengalami piloereksi.

**Tabel 14. Persentase jumlah yang mengalami perubahan perilaku *ptosis* tiap kelompok**

Kelompok dosis	<i>Ptosis</i> (%)					
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-24
Kontrol negatif (CMC)	0	0	0	0	0	0
Dosis I (5 mg/kg BB)	0	0	0	0	20	0
Dosis II (50 mg/kg BB)	0	0	0	20	0	0
Dosis III (300 mg/kg BB)	0	0	0	0	0	20
Dosis IV (2000 mg/kg BB)	0	0	0	40	20	0
Dosis V (5000 mg/kg BB)	0	0	20	0	20	20

Tabel 14 menunjukkan perubahan perilaku mencit yaitu *ptosis*. *Ptosis* adalah adanya gejala menutupnya mata mencit seperti mengantuk dimana kedua kelopak matanya tertutup sebagian atau seluruhnya, hal ini bisa disebabkan karena adanya efek sedasi dari sediaan uji yang diberikan. Tabel di atas terlihat sebelum semua kelompok diberi perlakuan semua kelompok mencit tidak menunjukkan adanya *ptosis*. Hampir dari semua kelompok dosis hewan uji mengalami *ptosis* setelah pemberian ekstrak etanol daun pletekan.

Perubahan pada *autonomic profile* yang diamati selain *ptosis* yaitu lakrimasi, katalepsi, vokalisasi dan salivasi. Lakrimasi merupakan pengeluaran air mata yang berlebihan, hal ini dapat diamati dengan mengusapkan *tissue* ke mata mencit untuk mengetahui adanya air mata yang keluar. Semua kelompok uji pada penelitian ini tidak mengalami lakrimasi. Katalepsi dilakukan dengan meletakan

kaki mencit pada batang pensil, hasil untuk semua kelompok dosis positif karena mencit bisa naik keatas.

**Tabel 15. Persentase jumlah yang mengalami perubahan frekuensi defekasi tiap kelompok**

Kelompok dosis	Defekasi (%)					
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-24
Kontrol negatif (CMC)	0	40	40	20	0	20
Dosis I (5 mg/kg BB)	0	40	20	60	20	60
Dosis II (50 mg/kg BB)	0	60	40	20	20	40
Dosis III (300 mg/kg BB)	20	20	60	40	0	40
Dosis IV (2000 mg/kg BB)	40	40	20	40	0	20
Dosis V (5000 mg/kg BB)	0	20	20	40	20	80

Tabel 15 menunjukkan perubahan perilaku mencit dalam hal defekasi. Parameter yang dilihat adalah terjadinya frekuensi defekasi dan konsistensi feses yang dihasilkan. Adanya defekasi menunjukkan adanya perubahan pada saluran pencernaan mencit. Frekuensi defekasi lebih sering terjadi pada saat sesudah pemberian sediaan uji dikarenakan mencit dipuaskan pakan 3-4 jam sebelum perlakuan. Setelah perlakuan terlihat semua mencit sudah mengalami defekasi dengan frekuensi normal tetapi kelompok dosis tertinggi mencit mengalami diare dengan konsistensi feses cair hal ini dikarenakan adanya perubahan pada saluran pencernaan akibat dari pemberian ekstrak etanol daun pletekan dengan dosis yang terlalu tinggi.

**Tabel 16. Persentase jumlah yang mengalami perubahan frekuensi urinasi tiap kelompok**

Kelompok dosis	Urinasi (%)					
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-24
Kontrol negatif (CMC)	0	40	20	20	0	20
Dosis I (5 mg/kg BB)	0	20	0	20	0	20
Dosis II (50 mg/kg BB)	20	40	40	20	0	40
Dosis III (300 mg/kg BB)	60	40	0	20	20	20
Dosis IV (2000 mg/kg BB)	20	0	20	0	0	20
Dosis V (5000 mg/kg BB)	0	0	0	20	0	0

Tabel 16 menunjukkan perubahan perilaku mencit dalam hal urinasi. Hal ini dapat menunjukkan adanya perubahan pada saluran kemih mencit yang mengarah pada pengaturan syaraf otonom. Hampir dari semua kelompok dosis

mengalami urinasi sebelum dan sesudah perlakuan, hal ini menunjukkan bahwa semua kelompok mencit tidak mengalami gangguan pada saluran kemih.

**Tabel 17. Persentase jumlah yang mengalami perubahan perilaku *writhing* tiap kelompok**

Kelompok dosis	<i>Writhing</i> (%)					
	Jam ke-0	Jam ke-0,5	Jam ke-1	Jam ke-2	Jam ke-4	Jam ke-24
Kontrol negatif (CMC)	0	0	0	0	0	0
Dosis I (5 mg/kg BB)	0	0	0	0	0	0
Dosis II (50 mg/kg BB)	0	20	60	0	0	20
Dosis III (300 mg/kg BB)	0	0	0	0	40	20
Dosis IV (2000 mg/kg BB)	0	0	20	40	20	0
Dosis V (5000 mg/kg BB)	0	20	20	40	100	20

*Writhing* berupa tarikan kaki ke belakang, penarikan kembali abdomen (retraksi) dan kejang tetani dengan membengkokkan kepala dan kaki belakang. *Writhing* ini terjadi karena mencit merasakan nyeri akibat dari pemberian sediaan uji. Pada tabel 16 kontrol negatif tidak mengalami *writhing*, dan *writhing* tersebut terjadi setelah pemberian sediaan uji.

### 3. Hasil pengamatan berat badan

Pengamatan berat badan hewan uji ditimbang sedikitnya 2 kali dalam 1 minggu (BPOM 2014). Pada penelitian ini penimbangan berat badan hewan uji dilakukan pada hari ke-1, 5, 10, dan 14.

**Tabel 18. Rata-rata berat badan mencit**

Kelompok dosis	Rata-rata berat badan (gram) $\pm$ SD (n=5)			
	Hari ke-1	Hari ke-5	Hari ke-10	Hari ke-14
Kontrol negatif (CMC)	17,77 $\pm$ 1,78	17,47 $\pm$ 3,02	18,44 $\pm$ 2,72	17,28 $\pm$ 4,41
Dosis I (5 mg/kg BB)	19,42 $\pm$ 2,20	18,71 $\pm$ 2,57	19,47 $\pm$ 2,41	19,95 $\pm$ 3,46
Dosis II (50 mg/kg BB)	19,36 $\pm$ 3,47	19,19 $\pm$ 4,60	20,16 $\pm$ 1,85	16,68 $\pm$ 2,30
Dosis III (300 mg/kg BB)	19,50 $\pm$ 3,60	19,10 $\pm$ 4,60	20,88 $\pm$ 1,74	20,44 $\pm$ 3,85
Dosis IV (2000 mg/kg BB)	19,81 $\pm$ 2,65	18,86 $\pm$ 4,26	20,48 $\pm$ 0,56	20,00 $\pm$ 3,19
Dosis V (5000 mg/kg BB)	19,24 $\pm$ 2,49	18,68 $\pm$ 3,42	20,64 $\pm$ 2,35	19,04 $\pm$ 4,19

Data berat badan mencit yang diperoleh dianalisis menggunakan uji ANOVA untuk mengetahui perbedaan antara berat badan mencit pada hari ke-1, 5, 10, dan 14. Hasil rata-rata bobot organ mencit dapat dilihat pada tabel 18.

Dari hasil normalitas *Kolmogrov-Smirnov* berat badan mencit terdistribusi normal karena nilai signifikansinya  $>0,05$ . Pada uji homogenitas berat badan mencit tidak homogen karena nilai signifikansinya  $<0,05$  sehingga data berat badan hewan uji dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*. Hasil uji *Kruskal Wallis*

berat badan mencit setelah dianalisis tidak berbeda secara bermakna ( $p>0,05$ ). Hasil uji statistik berat badan mencit dapat dilihat pada lampiran 17.

Tabel 18 menunjukkan rata-rata berat badan mencit pada hari ke-1, hari ke-5, hari ke-10, dan hari ke-14 dimana tidak terjadi kenaikan atau penurunan yang signifikan hingga hari ke-14. Penurunan berat badan hewan uji pada kelompok kontrol negatif maupun kelompok dosis diduga terjadi akibat stress yang dipicu oleh prosedur penelitian (Balcombe *et al* 2004). Stres akibat pemberian perlakuan secara oral menggunakan sonde kepada mencit betina dalam kondisi sadar dapat menyebabkan penurunan berat badan selama periode uji (Murphy *et al* 2001). Penurunan berat badan diduga bukan disebabkan oleh pemberian CMC 0,5% sebagai pelarut ekstrak karena substansi tersebut tidak bersifat toksik (Van Ginkel dan Gayton 1996).

Peningkatan berat badan mencit yang diberi perlakuan ekstrak etanol daun pletekan dapat disebabkan oleh peningkatan konsumsi pakan pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol daun pletekan. Hasil penimbangan berat badan hewan uji dapat dilihat pada lampiran 14.

#### 4. Hasil pengamatan bobot organ

Pada penelitian ini mencit ditimbang berat badannya pada hari pertama pengujian, hari ke-5, hari ke-10 dan hari ke-14. Hasil penimbangan berat organ mencit dapat dilihat pada lampiran 15. Setelah 14 hari mencit yang masih hidup dibius menggunakan kloroform, kemudian dibedah untuk diambil organ hati, jantung, ginjal, lambung, paru-paru, dan usus. Organ yang telah diambil kemudian ditimbang untuk mengetahui masing-masing bobot organ mencit, bobot organ tersebut digunakan untuk menentukan indeks organ.

**Tabel 18. Rata-rata bobot organ mencit**

Kelompok dosis	Rata-rata bobot organ (gram) $\pm$ SD (n=5)					
	Hati	Jantung	Ginjal	Lambung	Paru-paru	Usus
Kontrol negative	0,84 $\pm$ 0,37	0,12 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,16	0,19 $\pm$ 0,07	2,26 $\pm$ 0,67
Dosis 5 mg/kg BB	1,50 $\pm$ 0,23	0,12 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,05	0,59 $\pm$ 0,46	0,18 $\pm$ 0,07	2,51 $\pm$ 0,80
Dosis 50 mg/kg BB	0,89 $\pm$ 0,13	0,11 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,09	0,53 $\pm$ 0,40	0,14 $\pm$ 0,02	2,16 $\pm$ 0,65
Dosis 300 mg/kg BB	0,94 $\pm$ 0,24	0,12 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,04	0,53 $\pm$ 0,35	0,18 $\pm$ 0,05	2,30 $\pm$ 1,43
Dosis 2000 mg/kg BB	0,84 $\pm$ 0,25	0,13 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,07	0,47 $\pm$ 0,17	0,16 $\pm$ 0,04	2,23 $\pm$ 0,92
Dosis 5000 mg/kg BB	0,89 $\pm$ 0,39	0,10 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,06	0,39 $\pm$ 0,19	0,22 $\pm$ 0,07	2,23 $\pm$ 0,41

Data indeks organ mencit yang diperoleh dianalisis menggunakan uji ANOVA untuk mengetahui perbedaan antara organ yang telah diberi sediaan uji

dengan yang diberi perakuan kontrol negatif. Hasil rata-rata bobot organ mencit dapat dilihat pada tabel 18.

Syarat sebuah data dapat diuji ANOVA harus terdistribusi normal dan homogen. Jika data sudah menunjukkan terdistribusi normal dan homogeny maka dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA satu arah, bila terdapat data yang tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*. Tujuan pengujian ini adalah untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna dari masing-masing kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif. Jika hasil tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji *Post-hoc LSD*.

Dari hasil normalitas *Kolmogrov-Smirnov* semua organ yaitu hati, jantung, ginjal, lambung, paru, dan usus terdistribusi normal karena nilai signifikansinya  $>0,05$ . Pada uji homogenitas organ hati, jantung, paru, dan usus homogen karena nilai signifikansinya  $>0,05$ , sedangkan organ ginjal dan lambung tidak homogen karena nilai signifikansinya  $<0,05$  sehingga data organ hati, jantung, paru, dan usus bisa dilanjutkan dengan uji ANOVA satu arah dan data organ ginjal dan lambung dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*. Dari hasil uji ANOVA organ hati, jantung, paru, dan usus terdapat perbedaan secara bermakna ( $p>0,05$ ) sehingga dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc LSD* yang hasilnya setelah dianalisis tidak berbeda secara bermakna dengan kelompok kontrol negatif. Hasil uji *Kruskal Wallis* organ ginjal dan lambung setelah dianalisis tidak berbeda secara bermakna ( $p>0,05$ ). Hasil uji statistik indeks organ mencit dapat dilihat pada lampiran 18.

##### **5. Hasil pengamatan organ secara makroskopis**

Hasil pengamatan organ secara makroskopis pada semua kelompok uji terlihat normal karena tidak terdapat kerusakan pada organ mencit. Dari hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa sediaan uji ekstrak etanol daun pletakan tidak memberikan pengaruh pada semua organ bila dilihat secara makroskopis 14 hari setelah perlakuan oral tidak menyebabkan gangguan gastrointestinal. Hasil dapat dilihat pada lampiran 12.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Pemberian sediaan uji ekstrak etanol daun pletekan dapat diklasifikasikan praktis tidak toksik pada pemberian dosis sebesar 5000 mg/kg BB.
2. Pemberian ekstrak daun pletekan tidak mempengaruhi perubahan perilaku, perubahan syaraf otonom, dan perubahan neurologi pada mencit betina galur *BALB/c*.

#### **B. Saran**

Pertama, demi keberlanjutan perkembangan ilmu pengetahuan di bidang obat-obatan disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas dengan uji toksisitas subkronis bahkan uji toksisitas kronis agar didapatkan informasi lebih lanjut sehingga dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya.

Kedua, perlu dilakukan pengembangan lebih lanjut terhadap senyawa yang menyebabkan efek toksisitas pada daun pletekan.

## DAFTAR PUSTAKA

- [Anonim]. 2007. Acute systemic toxicity. *Institute of Laboratory Animal Resource Journal* 43: 527-530.
- [Anonim]. 2004. *Undang-undang Republik Indonesia Nomor 40 Tahun 2004 Tentang Sistem Jaminan Sosial Nasional*. Jakarta: Menteri Kesehatan.
- Adreanus A, Soemardji, Kumolosasi E, Aisyah C. 2002. Toksisitas akut dan penentuan DL<sub>50</sub> oral ekstrak air daun gandarusa (*Justicia gandarussa* Burm.F.) pada mencit swiss webster. *JMS* 7(2):57.
- Ahadi MR. 2003. Kandungan tanin terkondensasi dan laju dekomposisi pada serasah daun *Rhizospora mucronata lamk* pada ekosistem tambak Tumpangsari, Purwakarta, Jawa Barat [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Anief M. 2000. *Ilmu Meracik Obat Teori dan Praktik*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Ansel HC. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Ed ke-4. F Ibrahim, penerjemah; Jakarta: UI. Terjemahan dari: *Introduction to Pharmaceutical Dosage*. hlm 607.
- [BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2014. *Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis Secara in Vivo*. Jakarta: BPOM.
- Chaitanya K *et al.* 2012. Hypolipidemic and anti oxidant activity of *Ruellia tuberosa* Linn. *IJPBS* 2:63-72.
- Deaville ER, Givens DI, Mueller H. 2010. Chesnut and Mimosa Tannin Silages: Effect in sheep differ for apparent digestibility, nitrogen utilization and losses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 157: 129-138.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1979. *Farmakope Indonesia*. Ed ke-3. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia*. Ed ke-4. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes RI. 1995. *Materia Medika Indonesia*. Jilid VI. Ed ke-6. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Depkes RI. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 6-8, 8-10, 11-16, 24-27.

- Depkes RI. 1987. *Analisis Obat Tradisional*. Jilid I. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Ditjen POM RI] Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2009. *Konsep Pengembangan Obat Asli Indonesia*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.
- Donatus IA. 2005. *Toksikologi Dasar*. Yogyakarta: Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi UGM.
- Green, Lawrence W, Marchel WK. 1996. Health promoting planning an educational and environmental approach. *Mountain View*.
- Gunawan D, Mulyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam (Farmakologi)*. Jakarta: Penerbar Swadaya. hlm 122-126.
- Guyton AC, Hall JE. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Ed ke-9. Jakarta: EGC.
- Hargono D. 1999. Mengikuti jalannya upaya pengembangan obat tradisional. *Media Litbangkes* 8(3):22-26.
- Harmita, Radji M. 2004. *Analisis Hayati*. Jakarta: FMIPA Universitas Indonesia. hlm 47-54.
- Hayes AW. 1983. *Principles and Methods of Toxicology*. New York: Raven Press. hlm 4-23.
- Hodgson E, Wiley AJ, Son INC, editor. 2004. *A Textbook of Modern Toxicology*. Ed ke-3. Canada: Wiley-Interscience.
- Kondo MK, Yokota H. 2004. Feeding value to goats of whole oat ensiled with green tea waste. *Anim. Feed. Sci Technol* 113:71-81
- Loomis TA. 1978. *Toksikologi Dasar*. Ed ke-3. Donatus IA, penerjemah; Semarang: IKIP Semarang Press. Terjemahan dari: *Essentials of Toxicology*. hlm 1-4, 20, 22.
- Lu FC. 1991. *Toksikologi Dasar: Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Risiko*. Nugroho E, Pernerjemah; Indreswari E, editor. Jakarta: UI Press. Terjemahan dari: *Basic toxicology: Fundamentals, target organs, and risk assesment*.
- Lu FC. 1995. *Toksikologi Dasar*. Ed ke-2. Jakarta: UI-Press.
- Markham KR. 1982. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: Penerbit ITB.

- Price AS, Wilson ML. 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Brahm U, penerjemah; Jakarta: ECG.
- Rahmi NA. 2014. Efek hipoglikemik ekstrak air daun kencana ungu (*Ruellia tuberosa* L.) pada tikus wistar jantan. *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi* 2(2):50-53.
- Robinson T. 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Ed ke-6. Padmawinata K, penerjemah; Bandung: ITB.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Padmawinata K, penerjemah; Bandung: ITB. Terjemahan dari: *The Organic Constituents of Higher Plants 6<sup>th</sup> edition*. hlm 157.
- Shahwar D *et al.* 2011. Hypoglycemic activity of *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) in normal and alloxan-induced diabetic rabbits. *Iranian Journal of Pharmaceutical Science* 7(2):107-115.
- Sherwood L. 2001. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Ed ke-2. Jakarta: EGC.
- Steenis C. 1978. *Flora*. Jakarta: Paradnya Paramita.
- Sugiyanto. 2006. Peran aktivasi metabolik pada toksikologi biokimiawi xenobiotik [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.
- Tandri HT. 2009. Ekstrak air daun ceplikan (*Ruellia tuberosa* L.) serta pengaruhnya terhadap kadar glukosa darah dan gambaran histologis pankreas tikus putih (*Ratus norvegicus*) diabetes mellitus. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia* 6(2):64-70.
- Vitalia N, Najib A, Ahmad A. 2016. Uji toksisitas ekstrak daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dengan menggunakan metode brine shrimp lethality test (BSLT). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia* 3(1):124-129.
- Voigt R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Noeron S, penerjemah; Yogyakarta: UGM. Terjemahan dari: *Farmacy Technologies*. hlm 570-573.
- Wirasuta MAG, Niruri R. 2007. *Buku Ajar Toksikologi Umum*. Bali: Universitas Udayana. hlm 1-2.

*L*

*A*

*M*

*P*

*I*

*R*

*A*

*N*

## Lampiran 1. Hasil determiasi daun pletekan



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA  
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)  
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI  
(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)



Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911  
Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612  
Website: www.biologi.lipi.go.id

Cibinong, 27 Desember 2016

Nomor : 254/IPH.1.01/If.07/XII/2016  
Lampiran : -  
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.  
Bpk./Ibu/Sdr(i). **Novi Astuti**  
Mhs. Univ. Setia Budi  
Surakarta

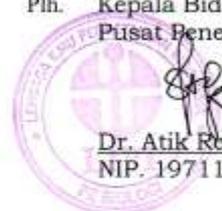
Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Pletekan	<i>Ruellia tuberosa</i> L.	Acanthaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Plh. Kepala Bidang Botani  
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,



Dr. Atik Retnowati  
NIP. 197111152000032005

## Lampiran 2. Sertifikasi hewan uji

### "ABIMANYU FARM"

√ Mencit putih jantan    √ Tikus Wistar    √ Swis Webster    √ Cacing  
 √ Mencit Balb/C    √ Kelinci New Zealand

Ngampon RT 04 / RW 04. Mojosongo Kec. Jebres Surakarta. Phone 085 629 994 33 / Lab USB Ska

---

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sigit Pramono

Selaku pengelola Abimanyu Farm, menerangkan bahwa hewan uji yang digunakan untuk penelitian, oleh:

Nama : Novi Astuti

Nim : 19133878A

Institusi : Universitas Setia Budi Surakarta

Merupakan hewan uji dengan spesifikasi sebagai berikut:

Jenis hewan : Mencit Balb/c

Umur : 2-3 bulan

Jenis kelamin : Betina

Jumlah : 30 ekor

Keterangan : Sehat

Asal-usul : Unit Pengembangan Hewan Percobaan UGM Yogyakarta

Yang pengembangan dan pengelolaannya disesuaikan standar baku penelitian. Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Surakarta, 9 Mei 2017

Hormat kami



Sigit Pramono

"ABIMANYU FARM"

**Lampiran 3. Gambar daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)**



**Tanaman pletekan**



**Daun pletekan**



**Daun pletekan kering**



**Serbuk daun pletekan**



**Ekstrak daun pletekan**

**Lampiran 4. Perhitungan penetapan kadar air serbuk daun pletekan****❖ Replikasi I**

Jumlah serbuk = 20 g

Jumlah pelarut = 125 ml

Jumlah air yang diperoleh 1,60 ml

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume air yang diperoleh}}{\text{berat serbuk mula-mula}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar air} = \frac{1,60 \text{ ml}}{20 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 8 \%$$

**❖ Replikasi II**

Jumlah serbuk = 20 g

Jumlah pelarut = 125 ml

Jumlah air yang diperoleh 1,75 ml

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume air yang diperoleh}}{\text{berat serbuk mula-mula}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar air} = \frac{1,75 \text{ ml}}{20 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 8,75 \%$$

**❖ Replikasi III**

Jumlah serbuk = 20 g

Jumlah pelarut = 125 ml

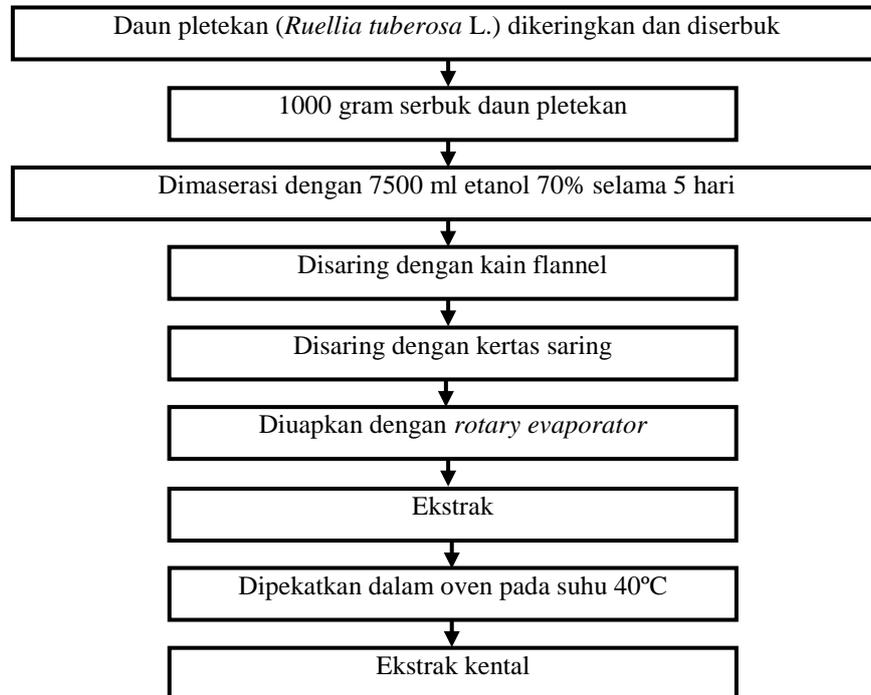
Jumlah air yang diperoleh 1,70 ml

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{volume air yang diperoleh}}{\text{berat serbuk mula-mula}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar air} = \frac{1,70 \text{ ml}}{20 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 8,5\%$$

$$\text{❖ Rata-rata kadar air dalam serbuk} = \frac{8\% + 8,75\% + 8,5\%}{3} = 8,4\%$$

**Lampiran 5. Skema pembuatan ekstrak daun pletekan**

**Lampiran 6. Hasil rendemen pengeringan daun pletekan**

Sampel	Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (%)
Daun pletekan	20000	2350	11,75

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot kering (g)}}{\text{bobot basah (g)}} \times 100\%$$

$$= \frac{2350 \text{ g}}{20000 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 11,75 \%$$

**Lampiran 7. Hasil rendemen ekstrak daun pletekan**

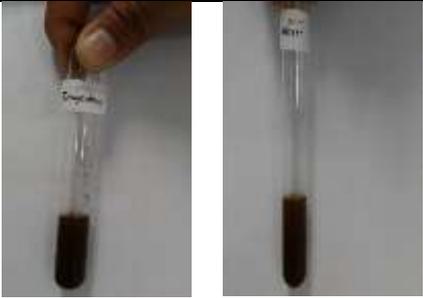
Sampel	Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Daun pletekan	1250	193,21	15,46

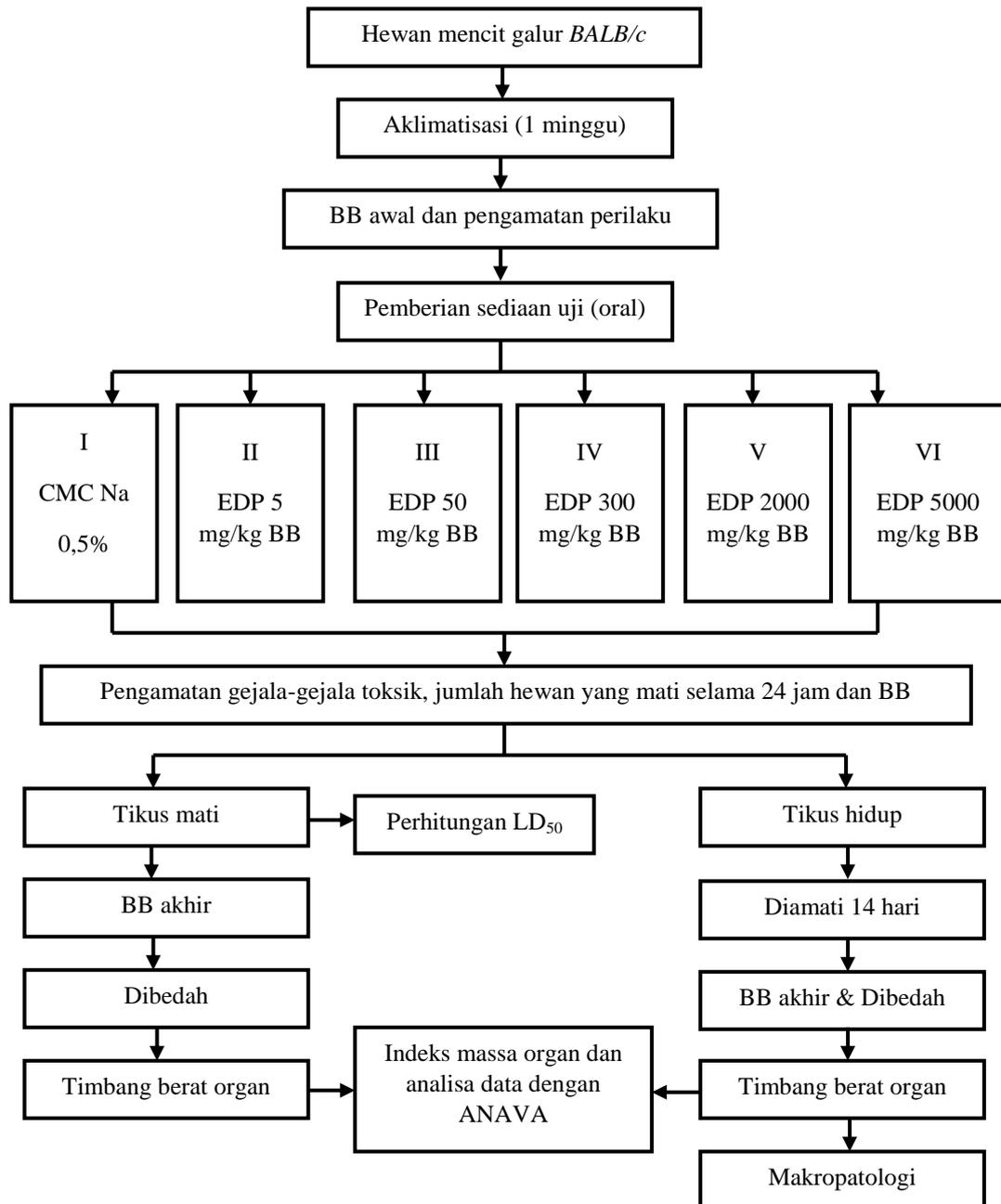
$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100\%$$

$$= \frac{193,21}{1250} \times 100\%$$

$$= 15,46\%$$

**Lampiran 8. Hasil identifikasi kandungan kimia daun pletekan**

Uji	Serbuk	Ekstrak
Saponin		
Flavonoid		
Alkaloid		
Tanin		

**Lampiran 9. Skema kerja uji toksisitas**

## Lampiran 10. Perhitungan pembuatan larutan stok dan dosis uji

### ❖ Perhitungan larutan stok

#### 1. Dosis 5 mg/kg BB

$$5 \text{ mg/kg BB} = 5 \text{ mg/1000 g BB}$$

$$= 1 \text{ mg/200 g BB tikus}$$

$$\rightarrow \text{Konversi ke mencit} = 1 \times 0,14 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

$$= 0,14 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

$$\rightarrow \text{Larutan stok } 0,2\% = 0,2 \text{ g/100 ml}$$

$$= 200 \text{ mg/100 ml}$$

$$= 2 \text{ mg/ml}$$

$$\rightarrow \text{Volume pemberian} = \frac{0,14 \text{ mg}}{2 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml}$$

$$= 0,07 \text{ ml}$$

#### 2. Dosis 50 mg/kg BB

$$50 \text{ mg/kg BB} = 50 \text{ mg/1000 g BB}$$

$$= 10 \text{ mg/200 g BB tikus}$$

$$\rightarrow \text{Konversi ke mencit} = 10 \times 0,14 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

$$= 1,4 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

$$\rightarrow \text{Larutan stok } 0,2\% = 0,2 \text{ g/100 ml}$$

$$= 200 \text{ mg/100 ml}$$

$$= 2 \text{ mg/ml}$$

$$\rightarrow \text{Volume pemberian} = \frac{1,4 \text{ mg}}{2 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml}$$

$$= 0,7 \text{ ml}$$

**3. Dosis 300 mg/kg BB**

$$300 \text{ mg/kg BB} = 300 \text{ mg/1000 g BB}$$

$$= 60 \text{ mg/200 g BB}$$

$$\rightarrow \text{Konversi ke mencit} = 60 \times 0,14 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

$$= 8,4 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

$$\rightarrow \text{Larutan stok } 6,5\% = 6,5 \text{ g/100 ml}$$

$$= 6500 \text{ mg/100 ml}$$

$$= 65 \text{ mg/ml}$$

$$\rightarrow \text{Volume pemberian} = \frac{8,4 \text{ mg}}{65 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml}$$

$$= 0,1 \text{ ml}$$

**4. Dosis 2000 mg/kg BB**

$$2000 \text{ mg/kg BB} = 2000 \text{ mg/1000 g BB}$$

$$= 400 \text{ mg/200 g BB tikus}$$

$$\rightarrow \text{Konversi ke mencit} = 400 \times 0,14 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

$$= 56 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

$$\rightarrow \text{Larutan stok } 6,5\% = 6,5 \text{ g/100 ml}$$

$$= 6500 \text{ mg/100 ml}$$

$$= 65 \text{ mg/ml}$$

$$\rightarrow \text{Volume pemberian} = \frac{56 \text{ mg}}{65 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml}$$

$$= 0,9 \text{ ml}$$

**5. Dosis 5000 mg/kg BB**

$$5000 \text{ mg/kg BB} = 5000 \text{ mg/1000 g BB}$$

$$= 1000 \text{ mg/200 g BB tikus}$$

→ Konversi ke mencit =  $1000 \times 0,14 \text{ mg}/20 \text{ g BB mencit}$

$$= 140 \text{ mg}/20 \text{ g BB menit}$$

→ Larutan stok 15% =  $15 \text{ g}/100 \text{ ml}$

$$= 15000 \text{ mg}/100 \text{ ml}$$

$$= 150 \text{ mg/ml}$$

→ Volume pemberian =  $\frac{140 \text{ mg}}{150 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml}$

$$= 0,9 \text{ ml}$$

❖ **Contoh perhitungan dosis uji**

**1. Diketahui :** BB mencit = 17,66 g

Dosis sediaan = 5 mg/kg BB tikus (0,14 mg/20 g BB mencit)

Larutan stok = 0,2%

**Maka,**  $\frac{17,66 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 0,14 = 0,12 \text{ mg}$

**Volume pemberian** =  $\frac{0,12 \text{ mg}}{2 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = \mathbf{0,06 \text{ ml}}$

**2. Diketahui :** BB mencit = 19,08 g

Dosis sediaan = 50 mg/kgBB tikus (1,4 mg/20 g BB mencit)

Larutan stok = 0,2%

**Maka,**  $\frac{19,08 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 1,4 = 1,3 \text{ mg}$

**Volume pemberian** =  $\frac{1,3 \text{ mg}}{2 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = \mathbf{0,7 \text{ ml}}$

**3. Diketahui :** BB mencit = 18,04 g

Dosis sediaan = 300 mg/kgBB tikus (8,4 mg/20 g BB  
mencit)

Larutan stok = 6,5%

$$\text{Maka, } \frac{18,04 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 8,4 \text{ mg} = 7,6 \text{ mg}$$

$$\text{Volume pemberian} = \frac{7,6 \text{ mg}}{65 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = \mathbf{0,1 \text{ ml}}$$

**4. Diketahui :** BB mencit = 20,78 g

Dosis sediaan = 2000 mg/kgBB tikus (56 mg/20 g BB  
mencit)

Larutan stok = 6,5%

$$\text{Maka, } \frac{20,78 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 56 \text{ mg} = 58,184 \text{ mg}$$

$$\text{Volume pemberian} = \frac{58,184 \text{ mg}}{65 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = \mathbf{0,9 \text{ ml}}$$

**5. Diketahui :** BB mencit = 16,20 g

Dosis sediaan = 5000 mg/kgBB tikus (140 mg/20 g BB  
mencit)

Larutan stok = 15%

$$\text{Maka, } \frac{16,20 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 140 \text{ mg} = 113,4 \text{ mg}$$

$$\text{Volume pemberian} = \frac{113,4 \text{ mg}}{150 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = \mathbf{0,8 \text{ ml}}$$

**Lampiran 11. Foto perlakuan hewan uji**



**Mencit betina**



**Pembedahan**



**Straub**



**Retablisme**



***Grooming***

**Lampiran 12. Pengamatan organ secara makroskopis**



**Organ mencit kel. I no. 2**

**Organ mencit kel. II no. 2**



**Organ mencit kel. III no. 2**

**Organ mencit kel. IV no. 2**



**Organ mencit kel. V no. 2**

**Organ mencit kel. VI no. 2**

**Lampiran 13. Alat-alat penelitian***Rotary evaporator**Moisture balance**Corong Buchner**Sterling Bidwell**Pinset, cotton bud, bulu ayam**Jarum oral**Platform**Botol maserasi*

### Lampiran 14. Penimbangan berat badan mencit

Mencit		Berat badan mencit (gram)			
		Hari ke-1	Hari ke-5	Hari ke-10	Hari ke-14
<b>Kelompok I</b>	1	20,50	18,88	18,17	23,79
	2	16,51	18,72	17,73	14,01
	3	15,91	12,23	15,01	12,88
	4	18,17	19,81	22,58	19,36
	5	17,77	17,72	18,72	16,34
<b>Rata-rata ± SD</b>		<b>17,77 ± 1,78</b>	<b>17,47 ± 3,02</b>	<b>18,44 ± 2,72</b>	<b>17,28 ± 4,41</b>
<b>Kelompok II</b>	1	21,73	19,03	15,82	25,74
	2	17,66	20,42	19,23	17,26
	3	19,67	16,56	20,52	18,19
	4	16,74	15,70	19,37	18,05
	5	21,32	21,82	22,43	20,51
<b>Rata-rata ± SD</b>		<b>19,42 ± 2,20</b>	<b>18,71 ± 2,57</b>	<b>19,47 ± 2,41</b>	<b>19,95 ± 3,46</b>
<b>Kelompok III</b>	1	24,35	24,01	20,75	17,65
	2	19,08	21,22	21,93	19,27
	3	17,56	13,82	19,51	15,61
	4	15,10	14,76	17,26	13,27
	5	20,72	22,14	21,35	17,58
<b>Rata-rata ± SD</b>		<b>19,36 ± 3,47</b>	<b>19,19 ± 4,60</b>	<b>20,16 ± 1,85</b>	<b>16,68 ± 2,30</b>
<b>Kelompok IV</b>	1	24,27	23,39	20,50	24,92
	2	18,04	21,24	21,81	19,41
	3	17,90	15,06	18,28	15,09
	4	15,26	13,30	20,87	19,41
	5	22,01	22,51	22,95	23,36
<b>Rata-rata ± SD</b>		<b>19,50 ± 3,60</b>	<b>19,1 ± 4,60</b>	<b>20,88 ± 1,74</b>	<b>20,44 ± 3,85</b>
<b>Kelompok V</b>	1	23,03	23,24	20,06	24,92
	2	20,78	22,27	21,23	18,42
	3	18,63	14,48	19,92	16,28
	4	15,97	14,26	20,88	19,86
	5	20,63	20,03	20,30	20,52
<b>Rata-rata ± SD</b>		<b>19,81 ± 2,65</b>	<b>18,86 ± 4,26</b>	<b>20,48 ± 0,56</b>	<b>20,00 ± 3,19</b>
<b>Kelompok VI</b>	1	22,24	23,44	20,73	24,86
	2	16,20	18,80	20,31	17,42
	3	19,58	16,72	23,62	18,88
	4	17,32	15,74	17,88	15,01
	5	20,88	-	-	-
<b>Rata-rata ± SD</b>		<b>19,24 ± 2,49</b>	<b>18,68 ± 3,42</b>	<b>20,64 ± 2,35</b>	<b>19,04 ± 4,19</b>

### Lampiran 15. Penimbangan berat organ mencit

Mencit	Berat organ mencit (gram)						
	Hati	Jantung	Ginjal	Lambung	Paru	Usus	
<b>Kelompok I</b>	1	1,46	0,15	0,34	0,38	0,23	2,27
	2	0,60	0,13	0,33	0,24	0,16	1,16
	3	0,61	0,10	0,19	0,44	0,15	2,21
	4	0,62	0,09	0,35	0,29	0,30	2,38
	5	0,93	0,11	0,26	0,66	0,12	2,85
<b>Rata-rata±SD</b>	<b>0,84±0,37</b>	<b>0,12±0,02</b>	<b>0,29±0,07</b>	<b>0,40±0,16</b>	<b>0,19±0,07</b>	<b>2,26±0,67</b>	
<b>Kelompok II</b>	1	1,20	0,13	0,30	0,37	0,23	2,95
	2	0,95	0,09	0,36	0,21	0,19	1,52
	3	1,09	0,08	0,36	0,28	0,25	2,25
	4	0,71	0,18	0,25	0,75	0,09	2,20
	5	1,30	0,11	0,29	1,32	0,12	3,61
<b>Rata-rata±SD</b>	<b>1,05±0,23</b>	<b>0,12±0,04</b>	<b>0,31±0,05</b>	<b>0,59±0,46</b>	<b>0,18±0,07</b>	<b>2,51±0,80</b>	
<b>Kelompok III</b>	1	0,80	0,12	0,25	0,32	0,17	1,89
	2	0,82	0,13	0,36	1,11	0,13	2,14
	3	0,92	0,12	0,34	0,27	0,14	1,93
	4	0,81	0,10	0,22	0,17	0,14	1,57
	5	1,10	0,08	0,15	0,75	0,13	3,27
<b>Rata-rata±SD</b>	<b>0,89±0,13</b>	<b>0,11±0,02</b>	<b>0,26±0,09</b>	<b>0,52±0,40</b>	<b>0,14±0,02</b>	<b>2,16±0,64</b>	
<b>Kelompok IV</b>	1	0,89	0,08	0,32	0,27	0,18	2,23
	2	0,70	0,14	0,36	0,59	0,10	2,22
	3	0,91	0,11	0,30	0,30	0,20	1,51
	4	0,84	0,11	0,36	0,43	0,17	0,87
	5	1,35	0,17	0,40	1,04	0,25	4,65
<b>Rata-rata±SD</b>	<b>0,94±0,24</b>	<b>0,12±0,03</b>	<b>0,35±0,04</b>	<b>0,53±0,31</b>	<b>0,18±0,05</b>	<b>2,30±1,43</b>	
<b>Kelompok V</b>	1	0,96	0,21	0,36	0,44	0,15	1,92
	2	0,65	0,10	0,24	0,27	0,17	1,48
	3	0,50	0,09	0,27	0,42	0,12	1,71
	4	1,03	0,12	0,40	0,49	0,23	2,81
	5	1,04	0,12	0,34	0,75	0,14	3,71
<b>Rata-rata±SD</b>	<b>0,84±0,25</b>	<b>0,13±0,05</b>	<b>0,32±0,07</b>	<b>0,47±0,17</b>	<b>0,16±0,04</b>	<b>2,33±0,92</b>	
<b>Kelompok VI</b>	1	1,47	0,13	0,31	0,25	0,21	2,60
	2	0,71	0,09	0,30	0,42	0,35	1,97
	3	1,11	0,11	0,33	0,24	0,18	1,97
	4	0,63	0,07	0,19	0,33	0,19	1,85
	5	0,53	0,08	0,22	0,71	0,19	2,75
<b>Rata-rata±SD</b>	<b>0,89±0,39</b>	<b>0,10±0,02</b>	<b>0,27±0,06</b>	<b>0,39±0,19</b>	<b>0,22±0,07</b>	<b>2,23±0,41</b>	

**Lampiran 16. Perhitungan indeks massa organ mencit**

<b>Mencit</b>		<b>Indeks massa organ mencit</b>					
		<b>Hati</b>	<b>Jantung</b>	<b>Ginjal</b>	<b>Lambung</b>	<b>Paru</b>	<b>Usus</b>
<b>Kelompok I</b>	1	0,061	0,006	0,014	0,016	0,001	0,114
	2	0,043	0,009	0,024	0,017	0,011	0,083
	3	0,047	0,008	0,015	0,034	0,012	0,172
	4	0,032	0,005	0,018	0,015	0,015	0,123
	5	0,057	0,007	0,016	0,040	0,007	0,174
<b>Rata-rata±SD</b>		<b>0,048±0,012</b>	<b>0,007±0,002</b>	<b>0,017±0,004</b>	<b>0,024±0,012</b>	<b>0,009±0,005</b>	<b>0,133±0,039</b>
<b>Kelompok II</b>	1	0,045	0,005	0,012	0,014	0,009	0,115
	2	0,055	0,005	0,027	0,012	0,011	0,088
	3	0,060	0,004	0,020	0,015	0,014	0,124
	4	0,040	0,010	0,040	0,042	0,005	0,122
	5	0,063	0,005	0,014	0,064	0,006	0,176
<b>Rata-rata±SD</b>		<b>0,053±0,010</b>	<b>0,006±0,002</b>	<b>0,023±0,011</b>	<b>0,030±0,023</b>	<b>0,009±0,003</b>	<b>0,125±0,032</b>
<b>Kelompok III</b>	1	0,045	0,007	0,014	0,018	0,010	0,107
	2	0,043	0,007	0,019	0,058	0,007	0,111
	3	0,059	0,008	0,022	0,017	0,009	0,124
	4	0,061	0,008	0,017	0,013	0,011	0,118
	5	0,063	0,005	0,009	0,043	0,007	0,186
<b>Rata-rata±SD</b>		<b>0,054±0,009</b>	<b>0,007±0,001</b>	<b>0,016±0,005</b>	<b>0,030±0,020</b>	<b>0,008±0,002</b>	<b>0,129±0,032</b>
<b>Kelompok IV</b>	1	0,036	0,003	0,013	0,011	0,007	0,090
	2	0,036	0,007	0,019	0,030	0,005	0,114
	3	0,060	0,007	0,020	0,020	0,013	0,100
	4	0,043	0,006	0,019	0,022	0,009	0,045
	5	0,058	0,007	0,017	0,045	0,011	0,199
<b>Rata-rata±SD</b>		<b>0,047±0,012</b>	<b>0,006±0,002</b>	<b>0,018±0,003</b>	<b>0,026±0,013</b>	<b>0,009±0,003</b>	<b>0,110±0,056</b>
<b>Kelompok V</b>	1	0,039	0,008	0,014	0,018	0,006	0,077
	2	0,035	0,005	0,013	0,015	0,009	0,080
	3	0,031	0,006	0,017	0,026	0,007	0,105
	4	0,052	0,006	0,020	0,025	0,012	0,141
	5	0,051	0,006	0,017	0,037	0,007	0,181
<b>Rata-rata±SD</b>		<b>0,042±0,009</b>	<b>0,006±0,001</b>	<b>0,016±0,003</b>	<b>0,024±0,009</b>	<b>0,008±0,002</b>	<b>0,117±0,044</b>
<b>Kelompok VI</b>	1	0,059	0,005	0,012	0,010	0,008	0,105
	2	0,041	0,005	0,017	0,024	0,020	0,113
	3	0,059	0,006	0,017	0,013	0,010	0,104
	4	0,042	0,005	0,013	0,022	0,013	0,123
	5	0,026	0,004	0,011	0,035	0,009	0,134
<b>Rata-rata±SD</b>		<b>0,045±0,014</b>	<b>0,005±0,000</b>	<b>0,014±0,003</b>	<b>0,021±0,010</b>	<b>0,012±0,005</b>	<b>0,116±0,013</b>

❖ **Contoh perhitungan indeks massa organ mencit**

**Mencit kelompok II no. 1 (dosis 5 mg/kg BB tikus)**

$$\text{indeks organ} = \frac{\text{berat organ (g)}}{\text{berat badan (g)}}$$

Berat badan hari ke 14 = 25,74 g

Berat organ :

- Hati : 1,20 g  $\rightarrow$  indeks organ =  $\frac{1,20 \text{ g}}{25,74 \text{ g}} = 0,046$
- Jantung : 0,13 g  $\rightarrow$  indeks organ =  $\frac{0,13 \text{ g}}{25,74 \text{ g}} = 0,005$
- Ginjal : 0,30 g  $\rightarrow$  indeks organ =  $\frac{0,30 \text{ g}}{25,74 \text{ g}} = 0,012$
- Lambung : 0,37 g  $\rightarrow$  indeks organ =  $\frac{0,37 \text{ g}}{25,74 \text{ g}} = 0,014$
- Paru : 0,23 g  $\rightarrow$  indeks organ =  $\frac{0,23 \text{ g}}{25,74 \text{ g}} = 0,009$
- Usus : 2,95 g  $\rightarrow$  indeks organ =  $\frac{2,95 \text{ g}}{25,74 \text{ g}} = 0,115$

### Lampiran 17. Hasil uji statistik berat badan mencit

1. Uji normalitas Kolmogorov-Smirnov dan Homogenitas Levene terhadap berat badan mencit
  - a. Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Berat_badan
N		117
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	19.1747
	Std. Deviation	3.02661
Most Extreme Differences	Absolute	.047
	Positive	.039
	Negative	-.047
Kolmogorov-Smirnov Z		.505
Asymp. Sig. (2-tailed)		.961

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**Keputusan** : Uji normalitas berat badan mencit **terdistribusi normal** ( $p > 0,05$ ).

- b. Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Berat\_badan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.086	3	113	.009

**Keputusan** : Uji homogenitas berat badan mencit **tidak homogen** karena didapatkan nilai signifikansi  $> 0,05$ .

**Kesimpulan** : Data berat badan mencit dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis karena syarat homogenitasnya belum terpenuhi.

## 2. Uji Kruskal Wallis

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Berat_badan
Chi-Square	3.754
Df	3
Asymp. Sig.	.289

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Hari

**Kesimpulan** : Data berat badan mencit **tidak berbeda secara bermakna ( $p > 0,05$ )** maka tidak bisa dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*).

### Lampiran 18. Hasil uji statistik indeks organ mencit

1. Uji normalitas Kolmogorov-Smirnov dan Homogenitas Levene terhadap indeks organ mencit

a. Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Hati	Jantung	Ginjal	Lambung	Paru	Usus
	N	30	30	30	30	30	30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.04807	.00617	.01733	.02570	.00937	.12160
	Std. Deviation	.010992	.001577	.005809	.014184	.003643	.035989
Most Extreme Differences	Absolute	.158	.170	.190	.173	.109	.207
	Positive	.111	.170	.190	.173	.109	.207
	Negative	-.158	-.130	-.113	-.134	-.091	-.119
	Kolmogorov-Smirnov Z	.868	.932	1.039	.948	.595	1.132
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.438	.350	.230	.330	.870	.154

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**Keputusan** : Uji normalitas indeks organ mencit seluruhnya **terdistribusi normal ( $p > 0.05$ )**.

b. Uji Homogenitas

**Test of Homogeneity of Variances**

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hati	.333	5	24	.888
Jantung	1.089	5	24	.392
Ginjal	3.810	5	24	.011
Lambung	3.272	5	24	.022
Paru	1.374	5	24	.269
Usus	1.093	5	24	.390

**Keputusan** : Uji homogenitas dari indeks organ **hati, jantung, paru, dan usus homogen ( $p > 0,05$ )**, sedangkan untuk **ginjal dan lambung tidak homogen ( $p < 0,05$ )**.

**Kesimpulan** : Data dari indeks organ hati, jantung, paru, dan usus dapat dilanjutkan dengan uji ANAVA karena sudah memenuhi syarat normalitas dan

homogenitas, sedangkan untuk indeks organ ginjal dan lambung dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis karena syarat homogenitasnya belum terpenuhi.

## 2. Uji ANAVA

		ANOVA				
		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Hati	Between Groups	.001	5	.000	.887	.505
	Within Groups	.003	24	.000		
	Total	.004	29			
Jantung	Between Groups	.000	5	.000	1.214	.333
	Within Groups	.000	24	.000		
	Total	.000	29			
Paru	Between Groups	.000	5	.000	.628	.680
	Within Groups	.000	24	.000		
	Total	.000	29			
Usus	Between Groups	.002	5	.000	.273	.923
	Within Groups	.036	24	.001		
	Total	.038	29			

**Keputusan :** Dari hasil uji ANAVA, terdapat **perbedaan secara bermakna pada data indeks organ hati, jantung, paru, dan usus karena memiliki nilai signifikansi > 0,05.**

**Kesimpulan :** Dari data organ hati, jantung, paru, dan usus dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk menentukan kelompok mana yang memberikan nilai yang berbeda secara bermakna dengan kelompok yang lainnya.

## 3. Uji Kruskal Wallis

Test Statistics <sup>a,b</sup>		
	Ginjal	Lambung
Chi-Square	4.467	.955
Df	5	5
Asymp. Sig.	.484	.966

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

**Kesimpulan :** Data indeks organ ginjal dan lambung **tidak berbeda secara bermakna ( $p > 0,05$ )** maka tidak bisa dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*)

## Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) kelompok perlakuan	(J) kelompok perlakuan				95% Confidence Interval	
			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
Hati	kontrol negative	dosis 5 mg/kg BB	-.004600	.007021	.519	-.01909	.00989
		dosis 50 mg/kg BB	-.006200	.007021	.386	-.02069	.00829
		dosis 300 mg/kg BB	.001400	.007021	.844	-.01309	.01589
		dosis 2000 mg/kg BB	.006400	.007021	.371	-.00809	.02089
		dosis 5000 mg/kg BB	.002600	.007021	.714	-.01189	.01709

Jantung	kontrol negative	dosis 5 mg/kg BB	.001200	.000980	.233	-.00082	.00322
		dosis 50 mg/kg BB	.000000	.000980	1.000	-.00202	.00202
		dosis 300 mg/kg BB	.001000	.000980	.318	-.00102	.00302
		dosis 2000 mg/kg BB	.000800	.000980	.422	-.00122	.00282
		dosis 5000 mg/kg BB	.002000	.000980	.052	-.00002	.00402

Paru	kontrol negative	dosis 5 mg/kg BB	.000200	.002382	.934	-.00472	.00512
		dosis 50 mg/kg BB	.000400	.002382	.868	-.00452	.00532
		dosis 300 mg/kg BB	.000200	.002382	.934	-.00472	.00512
		dosis 2000 mg/kg BB	.001000	.002382	.678	-.00392	.00592
		dosis 5000 mg/kg BB	-.002800	.002382	.251	-.00772	.00212

Usus	kontrol negative	dosis 5 mg/kg BB	.008200	.024337	.739	-.04203	.05843
		dosis 50 mg/kg BB	.004000	.024337	.871	-.04623	.05423
		dosis 300 mg/kg BB	.023600	.024337	.342	-.02663	.07383
		dosis 2000 mg/kg BB	.016400	.024337	.507	-.03383	.06663
		dosis 5000 mg/kg BB	.017400	.024337	.482	-.03283	.06763

Kesimpulan: Indeks organ dari keempat organ yaitu hati, jantung, paru, dan usus kelompok perlakuan setelah dianalisis **tidak berbeda secara bermakna** dengan kelompok kontrol negatif.

**Lampiran 19. Tabel pengamatan perilaku hewan uji kelompok I (CMC 0,5%)**

Efek yang diamati	Mencit 1 jam ke-						Mencit 2 jam ke-						Mencit 3 jam ke-					
	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24
Straub (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Piloereksi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflek pineal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reflek korneal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lakrimasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalepsi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Menggelantung (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retablisme (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fleksi (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harfer (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grooming (%)	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Defekasi (%)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Urinasi (%)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Salivasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vokalisasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Writhing (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Efek yang diamati	Mencit 4 jam ke-						Mencit 5 jam ke-					
	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24
Straub (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereksi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflek pineal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reflek korneal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lakrimasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalepsi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Menggelantung (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retablisme (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fleksi (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harfer (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grooming (%)	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Defekasi (%)	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinasi (%)	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Salivasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vokalisasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Writhing (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Lampiran 20. Tabel pengamatan perilaku hewan uji kelompok II (5 mg/kg BB tikus)**

Efek yang diamati	Mencit 1 jam ke-						Mencit 2 jam ke-						Mencit 3 jam ke-					
	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24
Straub (%)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Piloereksi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflek pineal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reflek korneal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lakrimasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalepsi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Menggelantung (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Retablisme (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Fleksi (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harfer (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grooming (%)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
Defekasi (%)	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Urinasi (%)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Salivasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vokalisasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Writhing (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Efek yang diamati	Mencit 4 jam ke-						Mencit 5 jam ke-					
	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24
Straub (%)	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Piloereksi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis (%)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Reflek pineal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reflek korneal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lakrimasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalepsi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Menggelantung (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retablisme (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fleksi (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harfer (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grooming (%)	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Defekasi (%)	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Urinasi (%)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vokalisasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Writhing (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Lampiran 21. Tabel pengamatan perilaku hewan uji kelompok III (50 mg/kg BB tikus)**

Efek yang diamati	Mencit 1 jam ke-						Mencit 2 jam ke-						Mencit 3 jam ke-					
	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24
Straub (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Piloereksi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflek pineal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reflek korneal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lakrimasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalepsi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Menggelantung (%)	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retablisme (%)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fleksi (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harfer (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grooming (%)	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Defekasi (%)	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+
Urinasi (%)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Salivasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vokalisasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Writhing (%)	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Efek yang diamati	Mencit 4 jam ke-						Mencit 5 jam ke-					
	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24
Straub (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereksi (%)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Reflek pineal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reflek korneal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lakrimasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalepsi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Menggelantung (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retablisme (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fleksi (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harfer (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grooming (%)	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Defekasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Urinasi (%)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Salivasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vokalisasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Writhing (%)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

**Lampiran 22. Tabel pengamatan perilaku hewan uji kelompok IV (300 mg/kg BB tikus)**

Efek yang diamati	Mencit 1 jam ke-						Mencit 2 jam ke-						Mencit 3 jam ke-					
	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24
Straub (%)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Piloereksi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Reflek pineal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reflek korneal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lakrimasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalepsi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Menggelantung (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retablisme (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fleksi (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harfer (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grooming (%)	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Defekasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Urinasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Salivasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vokalisasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Writhing (%)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Efek yang diamati	Mencit 4 jam ke-						Mencit 5 jam ke-					
	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24
Straub (%)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Piloereksi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflek pineal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reflek korneal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lakrimasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalepsi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Menggelantung (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retablisme (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fleksi (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harfer (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grooming (%)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Defekasi (%)	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Urinasi (%)	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Salivasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vokalisasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Writhing (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Lampiran 23. Tabel pengamatan perilaku hewan uji kelompok V (2000 mg/kg BB tikus)**

Efek yang diamati	Mencit 1 jam ke-						Mencit 2 jam ke-						Mencit 3 jam ke-					
	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24
Straub (%)	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Piloereksi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis (%)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflek pineal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reflek korneal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lakrimasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalepsi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Menggelantung (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retablisme (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fleksi (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harfer (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grooming (%)	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Defekasi (%)	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Urinasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Salivasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vokalisasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Writhing (%)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Efek yang diamati	Mencit 4 jam ke-						Mencit 5 jam ke-					
	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24
Straub (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereksi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis (%)	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Reflek pineal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reflek korneal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lakrimasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalepsi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Menggelantung (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retablisme (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fleksi (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harfer (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grooming (%)	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Defekasi (%)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Urinasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vokalisasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Writhing (%)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

**Lampiran 24. Tabel pengamatan perilaku hewan uji kelompok VI (5000 mg/kg BB tikus)**

Efek yang diamati	Mencit 1 jam ke-						Mencit 2 jam ke-						Mencit 3 jam ke-					
	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24
Straub (%)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereksi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Reflek pineal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reflek korneal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lakrimasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalepsi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Menggelantung (%)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retablisme (%)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fleksi (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harfer (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grooming (%)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Defekasi (%)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Urinasi (%)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vokalisasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Writhing (%)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-

Efek yang diamati	Mencit 4 jam ke-						Mencit 5 jam ke-					
	0	0,5	1	2	4	24	0	0,5	1	2	4	24
Straub (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereksi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptosis (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflek pineal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Reflek korneal (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lakrimasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalepsi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Menggelantung (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retablisme (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fleksi (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Harfer (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Grooming (%)	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Defekasi (%)	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Urinasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vokalisasi (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Writhing (%)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-