

# Uji Toksisitas Akut yang Diukur dengan Penentuan LD<sub>50</sub> Ekstrak Etanol Umbi Iles-iles (*Amorphophallus variabilis* Bl.) pada Tikus Putih *Strain* Wistar

Arfatul Makiyah, Sumirat Tresnayanti

Program Studi D-3 Keperawatan Universitas Muhammadiyah Sukabumi

## Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis uji toksisitas akut ekstrak etanol umbi iles-iles (*Amorphophallus variabilis* Bl.) dengan penentuan LD<sub>50</sub> pada tikus putih *strain* Wistar. Penelitian ini merupakan studi eksperimental laboratorium pada tikus putih *strain* Wistar. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Universitas Padjadjaran pada bulan April-Mei 2017. Tikus putih *strain* Wistar sebanyak 36 ekor dibagi menjadi 6 kelompok. Tikus putih *strain* Wistar pada setiap perlakuan diberikan secara oral ekstrak etanol umbi iles-iles selama 7 hari pada tanggal 20-27 April 2017. Parameter uji toksisitas akut ekstrak etanol umbi iles-iles dengan penentuan *Lethal Doses* (LD<sub>50</sub>) dengan dosis tunggal (*limited doses*) 2000 mg/kgBB menunjukkan tidak terjadi efek toksik dilihat dari bobot badan rata-rata sesudah perlakuan, perbandingan bobot badan antarkelompok sesudah perlakuan, kematian hewan coba (LD<sub>50</sub> 24 jam) dan gejala-gejala toksik klinis tikus putih *strain* Wistar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perubahan bobot badan tikus putih *strain* Wistar pada kelompok ekstrak etanol umbi iles-iles dosis 2000 mg/kgBB tidak menimbulkan efek toksik dibanding dengan kelompok ekstrak etanol umbi iles-iles dosis 220 mg/kgBB, 110 mg/kgBB dan 55 mg/kgBB ( $p < 0,05$ ), begitu juga jika dibanding dengan kelompok pembanding Na CMC 1% dan kontrol akuades ( $p < 0,05$ ). Dengan demikian, ekstrak etanol umbi iles-iles (*Amorphophallus variabilis* Bl.) tidak memiliki efek toksik pada gejala-gejala klinisnya. [MKB. 2017;49(3):145-55]

**Kata kunci:** Bobot badan, Ekstrak etanol, LD<sub>50</sub>, uji toksisitas akut, umbi iles-iles (*Amorphophallus variabilis* Bl.)

## Acute Toxicity Test of Ethanol Extract of Iles-Iles Tuber (*Amorphophallus variabilis* Bl.) by Measuring Its LD<sub>50</sub> in Wistar White Mice

## Abstract

This study aimed to analyze the acute toxicity test of ethanol extract of iles-iles tubers (*Amorphophallus variabilis* Bl.) through the measurement of LD<sub>50</sub> in Wistar White Mice. This study was a laboratory experimental study using Wistar white mice conducted at the Pharmacology Laboratory of Universitas Padjadjaran during the period of April to May 2017. Thirty six Wistar white mice were divided into 6 groups. The experimental Wistar mice in treatment group received oral ethanol extract of iles-iles tuber for 7 days between 20 and 27 April 2017. The acute toxicity test of the iles-iles tuber ethanol extract as measured using the Lethal Dose 50 (LD<sub>50</sub>) with a single dose (*limited doses*) of 2,000 mg/KgWt did not show any toxic effects as indicated by the mean body weight after treatment, weight ratio between groups after treatment, death of experimental animals (24 hours LD<sub>50</sub>), and clinical toxic symptoms of Wistar white mice. It was shown that the weight change in the mice receiving 2,000 mg/KgWt of iles-iles tuber ethanol extract did not lead to any toxic effect when compared to those receiving 220 mg/KgWt, 110 mg/KgWt, and 55 mg/KgWt ( $p < 0,05$ ). This was also true when compared to the comparison group of Na CMC 1% and aquadest control ( $p < 0,05$ ). Hence, iles-iles tuber (*Amorphophallus variabilis* Bl.) ethanol extract does not have any toxic effect based on the clinical symptoms. [MKB. 2017;49(3):145-55]

**Key words:** Acute toxicity test, body weight, ethanol extract, iles-iles tubers (*Amorphophallus variabilis* Bl.), LD<sub>50</sub>

---

**Korespondensi:** Arfatul Makiyah, S.Pd., M.Kes, Program Studi D-3 Keperawatan Universitas Muhammadiyah Sukabumi, Jalan R. Syamsudin, SH No. 50 Cikole Kota Sukabumi 43113, *E-mail:* arfa.makiyah.spd.mkes@gmail.com, arfatul367@ummi.ac.id

## Pendahuluan

Saat ini Indonesia mempunyai laboratorium penyakit terlengkap. Berbagai penyakit muncul ke permukaan, mulai dari penyakit infeksi, penyakit degeneratif, dan penyakit baru semacam campak Jerman, dan sindrom pernapasan akut parah (SARS).<sup>1</sup> Kesehatan merupakan unsur utama pembangunan sumber daya manusia (SDM), dan sudah saatnya pembangunan dilihat dari kualitas SDM-nya. Salah satu bidang baru dalam farmakologi yang masih dalam tingkat eksplorasi dan perdebatan adalah obat tradisional dan obat modern.<sup>2</sup>

Paradigma yang berkembang di masyarakat saat ini adalah bahwa ramuan tradisional yang bahan-bahan berasal dari alam tidak berbahaya dan tidak mempunyai efek samping. Anggapan itu tidaklah sepenuhnya benar. Oleh karena itu, diperlukan informasi yang menyampaikan batas aman penggunaan obat tradisional. Salah satu parameter awal yang diperlukan untuk mengevaluasi keamanan suatu obat (ramuan tradisional) adalah potensi ketoksikan akut obat atau ramuan tradisional terkait.<sup>3</sup>

Uji toksisitas akut adalah salah satu uji praklinik yang penting. Uji ini dirancang untuk menentukan efek toksik suatu senyawa yang akan terjadi dalam waktu yang singkat setelah pemajanan atau pemberiannya dalam takaran tertentu. Data kuantitatif yang diperoleh dari uji toksisitas akut ini adalah LD<sub>50</sub> (*lethal dose 50*). Berdasar atas data LD<sub>50</sub>, suatu senyawa dapat digolongkan sebagai bahan yang sangat toksik (*extremely toxic*) hingga bahan yang tidak toksik (*practically non toxic*). Data kualitatif yang diperoleh meliputi penampakan klinis, morfologis, dan mekanisme efek toksik.<sup>4</sup>

Umbi iles-iles (*Amorphophallus variabilis* Bl.) tergolong marga *Amorphophallus* dan termasuk ke dalam suku talas-talasan (*Araceae*). Tanaman umbi iles-iles merupakan salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat alami. Umbi iles-iles berkhasiat sebagai obat bisul, luka iris, dan luka karena gigitan binatang berbisa. Umbi iles-iles mempunyai kandungan kimia, yaitu air, glukomanan, saponin, flavonoid, pati, protein, lemak, serat kasar, dan kalsium oksalat. Daun iles-iles memiliki kandungan kimia, yaitu tanin. Kandungan kimia alami yang terdapat pada umbi iles-iles yang memiliki aktivitas antiinflamasi serta dapat memacu aktivitas makrofag sehingga meningkatkan sistem kekebalan tubuh adalah flavonoid, saponin, dan polisakarida.<sup>5</sup> Mengingat spektrum pemanfaatannya yang cukup luas terutama pada penyakit infeksi, diduga efek

yang ditimbulkan adalah efek positif sebagai imunostimulator.<sup>6</sup>

Mengingat betapa luas dan sering pemakaian umbi iles-iles ini sebagai obat, maka penggunaan tanaman ini harus melalui serangkaian uji, seperti uji khasiat, toksisitas, dan uji klinik. Dengan dasar tersebut dan mempertimbangkan potensinya yang cukup tinggi, maka penelitian ini bertujuan melakukan uji toksisitas akut ekstrak umbi iles-iles untuk menetapkan potensi ketoksikan akut umbi iles-iles.<sup>7</sup>

Penelitian ini dilakukan secara *in vivo*, menggunakan hewan coba tikus putih *strain* Wistar dengan paparan tunggal dosis bertingkat. Pengamatan meliputi jumlah hewan yang mati serta gejala klinis ketoksikan akut senyawa pada 24 jam pertama pemberian ekstrak umbi iles-iles. Untuk mengetahui pengaruh pada organ tubuh dilakukan uji toksisitas akut yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol umbi iles-iles selama 30 menit, 1 jam, 4 jam, 1 minggu, dan 2 minggu secara terus menerus. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan gambaran berharga kepada masyarakat tentang batas keamanan ekstrak umbi iles-iles sehingga dapat dijadikan acuan untuk penggunaan selanjutnya dalam pemanfaatan umbi iles-iles sebagai obat.

## Metode

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan desain *post test only control group design*. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih galur *strain* Wistar yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan. Subjek penelitian adalah 36 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) *strain* Wistar yang telah diperoleh dari Laboratorium Biofarma Bandung.

Penentuan nilai LD<sub>50</sub> ini dengan memakai metode *up and down procedure* dengan uji batas dosis (*limit test*), yaitu sebelum diberikan perlakuan, setiap kelompok perlakuan yang terdiri atas lima ekor tikus putih *strain* Wistar dipuaskan (tidak diberikan makan) terlebih dahulu selama 3–4 jam dengan tetap diberikan minum (*ad libitum*). Setelah dipuaskan tikus putih *strain* Wistar ditimbang dan kemudian satu tikus putih *strain* Wistar diberikan dosis tunggal ekstrak etanol umbi iles-iles secara oral dengan dosis 2.000 mg/kgBB yang telah disuspensikan dalam Na CMC 1%. Volume administrasi obat (VAO) dihitung sesuai dengan bobot tikus putih *strain* Wistar; volume dosis tunggal yang diberikan kepada tikus putih *strain*

Wistar tidak lebih dari 2 mL/220 mg.<sup>8</sup> Lima ekor tikus putih *strain* Wistar yang lain digunakan sebagai kontrol. Untuk tikus putih *strain* Wistar kontrol hanya diberikan suspensi Na CMC 1% dengan volume pemberian sama dengan volume yang diberikan pada tikus putih *strain* Wistar yang diuji. Ketika sampel uji telah diberikan, tikus putih *strain* Wistar tidak diberikan makan (tetap diberikan minum) selama 1–2 jam, dan kemudian tikus putih *strain* Wistar diberikan makan kembali secara *ad libitum*. Tikus putih *strain* Wistar diamati setiap 30 menit selama 4 jam dan selanjutnya diamati setiap hari sampai 14 hari. Tanda-tanda toksisitas yang diamati meliputi, kulit dan bulu, mata, letargi (kelesuan), konvulsi (kejang), tremor (gemetar), diare, dan kematian.

Dua hari berikutnya pengujian toksisitas ekstrak dilanjutkan pada dua puluh enam ekor tikus putih *strain* Wistar lain dari kelompok lain dengan perlakuan sebelum dan sesudah pemberian ekstrak sama seperti tikus putih *strain* Wistar sebelumnya. Pengujian ini dilakukan oleh karena pada 48 jam setelah pemberian ekstrak untuk tikus putih *strain* Wistar pertama masih hidup dan tidak memperlihatkan tanda-tanda toksisitas ataupun kematian. Pengamatan bobot tikus putih *strain* Wistar dilakukan dengan menimbang bobot tikus putih *strain* Wistar setiap hari sampai hari ke-14.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. Penelitian dilakukan bulan April–Mei 2017. Tikus putih harus diberikan perlakuan adaptasi terhadap kondisi laboratorium yang akan digunakan sebelum diberikan perlakuan selama 7 hari pada tanggal 20–27 April 2017, di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. Setelah masa adaptasi tikus tidak boleh melebihi bobot badan 250–300 gram atau sakit.<sup>9</sup>

Bahan-bahan yang dipergunakan di dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol umbi iles-iles. Umbi iles-iles, hasil determinasi tanaman di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung (ITB) menyatakan tanaman tersebut adalah *Amorphophallus variabilis* Bl. dari suku Araceae. Umbi iles-iles sebagai bahan uji diambil dari perkebunan di daerah Depok dan Majalengka, Jawa Barat. Umbi yang dipilih adalah umbi iles-iles dewasa yang siap panen, kemudian dilakukan ekstraksi di Laboratorium Farmasi ITB, akuades steril (*aquabidest*), NaCl 0,9% bebas pirogen, alkohol 70% dan metanol absolut, antikoagulan EDTA, asam asetat glasial, Na CMC 1%, dan

larutan *phosphate buffer saline* (PBS) dan larutan chloroform untuk eutanasi hewan uji coba, yaitu tikus putih *strain* Wistar.

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah perangkat alat pengukur berat (timbangan hewan, timbangan digital Agis (skala 0–2.000 gram) dengan ketelitian 0,01 gram), peralatan adaptasi hewan coba (kandang tikus, tempat minum tikus, *feeding tube* FR-5), peralatan alat pembuat ekstrak etanol umbi iles-iles (maserator, *rotary evaporator*, oven), peralatan pemberian ekstrak etanol umbi iles-iles secara oral (suntik oral 5 mL dengan jarum ukuran 18 *gauge*, botol untuk menyimpan dosis), mikro pipet/pipet *Eppendorf*, pipet, peralatan pengambilan cairan peritoneal (peralatan bedah minor, erlenmeyer 500 mL, spuit injeksi 1 mL, 3 mL, 5 mL, dan 10 mL), cover glass dan object glass, minyak imersi, sentrifugator 2.500 rpm), LCD *notebook*, dan peralatan dokumentasi, yaitu kamera digital.

Pemilihan sampel dilakukan dengan cara simple random sampling yang kemudian dibagi menjadi lima kelompok. Jumlah sampel minimal dihitung dengan menggunakan rumus Federer ( $r$ : jumlah sampel,  $t$ : jumlah perlakuan)  $(r-1)(t-1) \geq 15$ . Jumlah sampel minimal untuk setiap kelompok perlakuan harus lebih dari atau sama dengan 5. Hewan coba harus memenuhi kriteria sampai mencukupi jumlah sampel, maka hewan yang dibutuhkan dalam penelitian ini, yaitu 36 ekor.

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur *strain* Wistar berusia 2–3 bulan dan bobot badan 250–300 gram. Sebelum digunakan sebagai hewan coba, semua tikus putih dipelihara terlebih dahulu selama kurang lebih satu minggu untuk penyesuaian lingkungan, mengontrol kesehatan dan berat badan, serta menyeragamkan makanannya.

Umbi iles-iles yang telah dipilih, dibersihkan dengan air mengalir yang bersih, kemudian diiris setipis mungkin dengan pisau *stainless steel* agar tidak terjadi reaksi kimia yang merugikan. Umbi iles-iles kemudian ditimbang sehingga diperoleh bobotnya. Kemudian umbi iles-iles tersebut dikeringkan pada ruangan yang tidak terkena cahaya matahari langsung selama 2 hari. Ciri khusus tanaman yang sudah kering adalah bobot umbinya sudah berkurang 70–80% dari bobot umbi segarnya dan disebut simplisia. Simplisia ini kemudian dihaluskan sehingga menjadi serbuk dengan alat *grinding*, kemudian ditimbang sehingga diperoleh bobotnya sebelum diekstraksi.

Simplisia kemudian dimasukkan ke dalam

maserator yang telah diberi alas kapas dan pelarut etanol, didiamkan selama 24 jam, kemudian dikeluarkan dari *outlet* maserator, dan disebut ekstrak encer. Pelarut baru ditambahkan ke dalam ampas yang ada di dalam maserator, begitu seterusnya sampai pelarut yang keluar dari *outlet* maserator tidak berwarna lagi (biasanya setelah 5–6 kali rendaman). Ekstrak encer yang didapat kemudian dipekatkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* sampai pekat atau sampai tidak ada lagi pelarut yang menetes di kondensor *rotary evaporator*. Ekstrak pekat biasanya berbentuk pasta.

Dosis ini didapatkan hasil konversi dosis lazim pada manusia dengan perhitungan sebagai berikut: Bobot bersih simplisia umbi iles-iles 1.500 gram; Bobot bersih ekstrak etanol umbi iles-iles 41,6 gram ( $\pm 2\%$  bobot simplisia); Dosis lazim simplisia pada manusia per hari ialah 3x1 sendok serbuk simplisia = 3x10 gram = 30 g simplisia; Dosis ekstrak etanol umbi iles-iles pada manusia (70 kg) per hari ialah  $2\% \times 30$  g simplisia 0,6 g ekstrak etanol umbi iles-iles; Dosis ekstrak etanol umbi iles-iles pada tikus (200 mg) per hari ialah  $0,018 \times 0,6$  gram = 0,0108 gram = 10,8 mg  $\approx$  11 mg = 55 mg/kgBB.

Tiga puluh ekor tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan untuk uji toksisitas akut. Kemudian tikus diadaptasikan selama 7 hari dengan pemberian pellet, agar tikus sehat. Perlakuan dilakukan selama 7 hari. Untuk melihat uji toksisitas akut dengan pemberian ekstrak dilakukan secara oral dengan dosis tunggal limited LD<sub>50</sub> masing-masing perlakuan sebagai berikut: kelompok I (ekstrak etanol umbi iles-iles dosis 55 mg/kgBB); kelompok II (ekstrak etanol umbi iles-iles dosis 110 mg/kgBB); kelompok III (ekstrak etanol umbi iles-iles dosis 220 mg/kgBB); kelompok IV (ekstrak etanol umbi iles-iles dosis 2000 mg/kgBB); kelompok V (kontrol positif menggunakan Na CMC 1%) dan Kelompok VI (kontrol negatif menggunakan 5 mL akuades).

Seri dosis ekstrak etanol umbi iles-iles dibuat dengan melarutkan 2000 mg, 220 mg, 110 mg, dan 55 mg ekstrak etanol umbi iles-iles ditambahkan pelarut (larutan akuades sebanyak 5 ml/ekor tikus putih *strain* Wistar). Akuades digunakan sebagai kontrol pelarut maupun kontrol normal. Pada hari ke 7 tikus disuntik dengan secara oral dengan ekstrak etanol dosis 55 mg/kgbb, 110 mg/kgBB, 220 mg/kgBB, dan 2000 mg/kgBB, kemudian dibiarkan dalam 30 menit, 4 jam, 24 jam, 48 jam, 1 minggu, dan 2 minggu.

Sediaan uji diberikan pada hewan coba

secara oral, satu kali selama masa uji. Sebelum perlakuan, tikus putih *strain* Wistar ditimbang terlebih dahulu. Kemudian setelah perlakuan diberikan, dilakukan pengamatan gejala toksik yang muncul pada hewan coba.

Pengamatan dilakukan secara terus menerus pada 30 menit pertama, dan selanjutnya dilakukan setiap hari. Kriteria pengamatan meliputi pengamatan fisik spektrum efek toksik berdasar atas daftar yang telah disusun oleh Loomis, jumlah tikus yang mati selama masa penelitian, dan bobot badan tikus putih *strain* Wistar.<sup>10</sup> Pada hari kelima belas, hewan coba yang masih hidup ditimbang dan kemudian dilakukan terminasi. Data jumlah hewan coba yang mati dianalisis dengan analisis probit untuk menentukan nilai LD<sub>50</sub> yang selanjutnya dipakai untuk mengevaluasi potensi toksisitas akut ekstrak etanol umbi iles-iles mengikuti kriteria Gleason M. N. Data mengenai gejala-gejala toksik yang tampak pada fungsi vital, secara kualitatif digunakan untuk mengevaluasi wujud efek toksik yang timbul.

Setelah hasil penelitian terkumpul, kemudian dilakukan pengolahan data dengan urutan sebagai berikut: data yang diperoleh dari hasil uji toksisitas akut LD<sub>50</sub> diuji dengan limited software AOT 425 *StatPgm*, perubahan bobot badan tikus putih *strain* Wistar dari setiap kelompok telah terkumpul, analisis awal dilakukan pengujian distribusi data; Analisis data tersebut dilakukan menggunakan uji ANOVA satu arah untuk melihat ada tidaknya perbedaan efek perlakuan yang diberikan antara kelompok tikus putih *strain* Wistar yang diberikan perlakuan dan tikus putih *strain* Wistar kontrol pada taraf signifikansi 5% ( $p < 0,05$ ). Untuk melengkapi hasil perbandingan antara kelima kelompok pengamatan, dibuat penggambaran grafik ke dalam diagram batang dan rata-rata setiap variabel.

Dalam penelitian ini dipergunakan hewan coba tikus putih galur *strain* Wistar untuk menggantikan manusia, sebab zat atau alat baru tidak boleh digunakan untuk pertama kali pada manusia, kecuali bila sebelumnya telah diuji pada hewan dan diperoleh kesan yang cukup mengenai keamanannya.<sup>11</sup>

## Hasil

Subjek penelitian terdiri atas 36 ekor tikus *strain* Wistar yang telah melewati masa adaptasi di laboratorium selama tujuh hari, memenuhi kriteria inklusi, dan tidak memenuhi kriteria eksklusi. Hasil penelitian uji toksisitas akut



**Tabel 1 Karakteristik Ekstrak Etanol Umbi Iles-iles**

Parameter	Ekstrak Etanol
Kadar air (%)	8,0
Kadar karbohidrat (%)	85
Kadar protein (%)	7,0

ekstrak etanol umbi iles-iles dilakukan dengan membandingkan dengan kontrol (Na CMC 1%) dan akuades. Setelah hasil penelitian terkumpul, kemudian dilakukan pengolahan data dengan analisis awal dilakukan pengujian distribusi data, kemudian selanjutnya dilakukan analisis uji ANOVA untuk melihat ada tidaknya perbedaan efek perlakuan yang diberikan antara kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif. Untuk melengkapi hasil perbandingan antara kelima kelompok pengamatan, dibuat penggambaran grafis ke dalam diagram batang dan rata-rata setiap variabel.

Ekstraksi 20 kg umbi iles-iles dengan metode perkolasi menghasilkan 156,1297 g ekstrak pasta. Simplisia umbi iles-iles yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kadar air 8,0%. Sebanyak 1.500 gram umbi iles-iles yang diekstraksi dengan etanol 96% diperoleh ekstrak pasta sebanyak 30 gram, sehingga diperoleh nilai rendemen ekstrak sebesar 2%.

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa kandungan utama pada ekstrak etanol umbi iles-iles

yang digunakan dalam penelitian ini adalah karbohidrat, yaitu 85%. Hasil penapisan fitokimia yang terdapat pada ekstrak etanol umbi iles-iles adalah alkaloid, saponin, dan triterpenoid.<sup>7</sup>

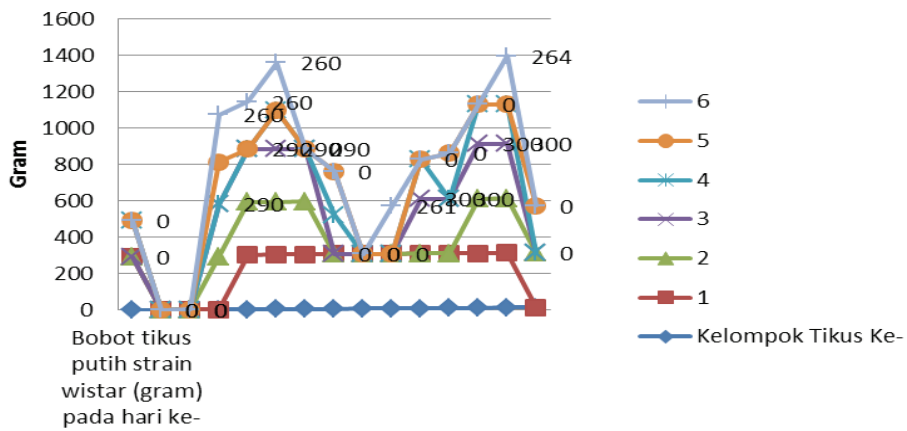
Pengamatan tanda-tanda toksisitas meliputi keadaan kulit dan bulu, mata, letargi (kelesuan), konvulsi (kejang), tremor (gemetar), diare, dan kematian. Pada saat pengamatan tanda-tanda toksisitas, yaitu setelah pemberian dosis terendah dan tunggal ekstrak etanol umbi iles-iles 2.000 mg/kgBB pada tikus putih *strain* Wistar tidak ditemukan tanda-tanda toksisitas tersebut. Tikus putih *strain* Wistar yang diberikan perlakuan ini memiliki aktivitas yang sama dengan tikus putih *strain* Wistar kontrol (Gambar 1).

Perubahan bobot tikus putih *strain* Wistar ini dianalisis menggunakan analisis *varian one way* ANOVA dan menunjukkan bahwa bobot tikus putih *strain* Wistar kontrol dan bobot tikus putih *strain* Wistar dengan perlakuan 2.000 mg/kgBB, tidak berbeda secara bermakna. Semua tikus putih *strain* Wistar yang digunakan dalam uji toksisitas dengan dosis 2.000 mg/kgBB tidak mengalami kematian sehingga nilai LD<sub>50</sub> ekstrak etanol umbi iles-iles adalah lebih dari 2.000 mg/kgBB. Penentuan ini menggunakan *software* AOT 425 StatPgm. Penentuan hasil uji toksisitas akut dengan menggunakan *software* AOT 425 StatPgm (Gambar 2).

Pada Tabel 3 dapat dilihat hasil pengamatan tanda-tanda toksisitas yang menunjukkan hasil

**Tabel 2 Perbedaan Rata-rata Bobot Badan Tikus Putih *Strain* Wistar**

Kelompok Tikus	Rata-rata Bobot Tikus Putih <i>Strain</i> Wistar (gram) pada Hari Ke-							
	0	1	2	3	4	5	6	7
1	290	264,4	262,7	290,8	300	300	300	300
2	280,2	256,9	272,9	290	290	290	290	275,8
3	280,4	257,9	277,2	290	290	290	290	273,5
4	200	257,8	213,6	210,5	210,8	212	212,9	215
5	220,3	251,9	226,2	230	230,5	230,7	230,9	240
6	250,4	254,2	255,4	260	260	260	260,5	266,5
Kelompok Tikus	8	9	10	11	12	13	14	
1	300	300	300	300	300	300	301,8	
2	290,4	290,5	290,7	290,9	300	300	300	
3	290,7	290,9	300	300	300	300	289,1	
4	215,5	215,9	217	217,5	217	218	229,2	
5	240,5	240,7	240,9	250	250,5	250,7	260	
6	260,9	261	262,5	262,7	262,9	264	261,2	



Gambar 1 Grafik Perbedaan Bobot Badan Tikus Putih *Strain* Wistar

normal, yaitu kulit, bulu, dan mata).

Efek ekstrak etanol umbi iles-iles pada rata-rata perubahan bobot badan tikus putih *strain* Wistar sesudah perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.

Pada Tabel 4 dapat dilihat bahwa efek ekstrak etanol umbi iles-iles pada rata-rata perubahan bobot badan tikus putih *strain* Wistar sesudah perlakuan ekstrak etanol umbi iles-iles tidak bermakna dibanding dengan kontrol. Hal ini

Tabel 3 Hasil Pengamatan Tanda-tanda Toksisitas

Pengamatan	30 Menit							4 Jam							24 Jam							
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	
Kulit dan Bulu	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Mata	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Letargi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Konvulsi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mati	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pengamatan	48 Jam							1 Minggu							2 Minggu							
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	
Kulit dan Bulu	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Mata	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Letargi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Konvulsi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mati	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

N: Normal, (-) : Tidak terjadi

**Tabel 4 Rata-rata Perubahan Bobot Badan Tikus Putih Strain Wistar Sesudah Perlakuan**

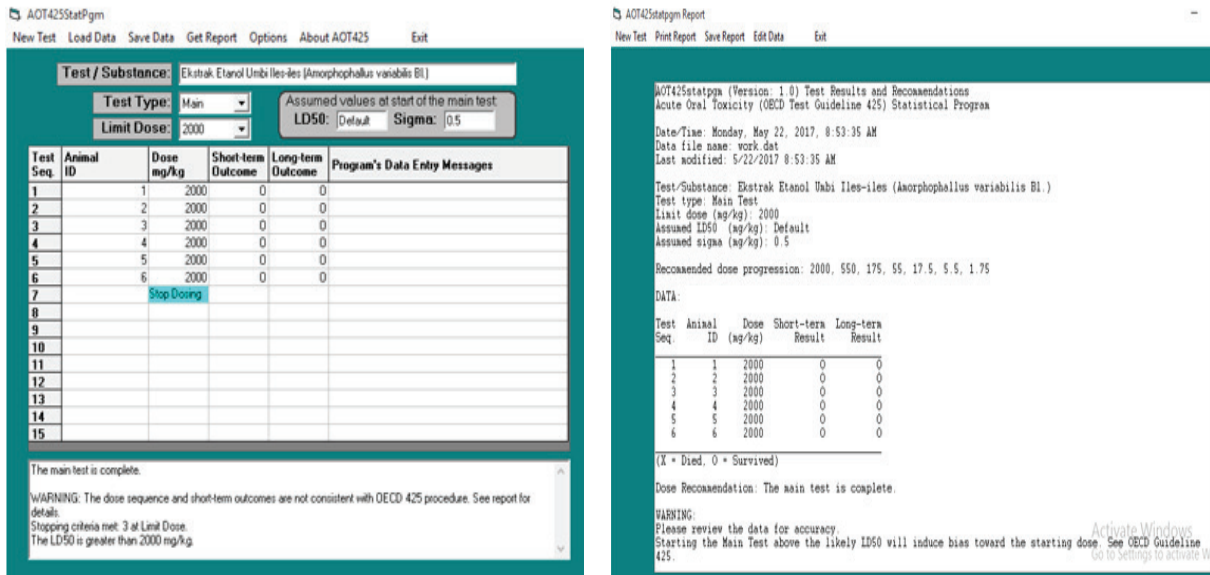
Waktu	Kelompok Perlakuan	N	Nilai Toksisitas Akut
30 Menit	Ekstrak iles-iles dosis 55 mg/kg	6	(231,75 ± 21,45)
	Ekstrak iles-iles dosis 110 mg/kg	6	(250,26 ± 0,33)
	Ekstrak iles-iles dosis 220 mg/kg	6	(252,13 ± 3,92)
	Ekstrak iles-iles dosis 2.000 mg/kg	6	(260,18 ± 0,24)
	Na CMC 1% (kontrol positif)	6	(260,53 ± 0,19)
	Akuades (kontrol negatif)	6	(260,67 ± 0,15)
4 Jam	Ekstrak iles-iles dosis 55 mg/kg	6	(260,55 ± 0,60)
	Ekstrak iles-iles dosis 110 mg/kg	6	(261,21 ± 0,25)
	Ekstrak iles-iles dosis 220 mg/kg	6	(261,60 ± 0,10)
	Ekstrak iles-iles dosis 2.000 mg/kg	6	(262,21 ± 0,24)
	Na CMC 1% (kontrol positif)	6	(261,41 ± 0,34)
	Akuades (kontrol negatif)	6	(262,25 ± 0,30)
24 Jam	Ekstrak iles-iles dosis 55 mg/kg	6	(257,83 ± 2,78)
	Ekstrak iles-iles dosis 110 mg/kg	6	(256,98 ± 14,8)
	Ekstrak iles-iles dosis 220 mg/kg	6	(257,98 ± 7,33)
	Ekstrak iles-iles dosis 2.000 mg/kg	6	(264,36 ± 2,18)
	Na CMC 1% (kontrol positif)	6	(251,91 ± 9,63)
	Akuades (kontrol negatif)	6	(254,23 ± 3,50)
48 Jam	Ekstrak iles-iles dosis 55 mg/kg	6	(262,73 ± 15,08)
	Ekstrak iles-iles dosis 110 mg/kg	6	(272,90 ± 8,11)
	Ekstrak iles-iles dosis 220 mg/kg	6	(213,60 ± 19,46)
	Ekstrak iles-iles dosis 2.000 mg/kg	6	(277,21 ± 10,42)
	Na CMC 1% (kontrol positif)	6	(226,20 ± 6,66)
	Akuades (kontrol negatif)	6	(255,45 ± 5,65)
1 Minggu	Ekstrak iles-iles dosis 55 mg/kg	6	(215,00 ± 0,00)
	Ekstrak iles-iles dosis 110 mg/kg	6	(275,80 ± 9,27)
	Ekstrak iles-iles dosis 220 mg/kg	6	(273,55 ± 9,35)
	Ekstrak iles-iles dosis 2.000 mg/kg	6	(300,00 ± 0,00)
	Na CMC 1% (kontrol positif)	6	(240,00 ± 0,00)
	Akuades (kontrol negatif)	6	(266,46 ± 5,20)
2 Minggu	Ekstrak iles-iles dosis 55 mg/kg	6	(229,16 ± 11,28)
	Ekstrak iles-iles dosis 110 mg/kg	6	(300,00 ± 0,00)
	Ekstrak iles-iles dosis 220 mg/kg	6	(289,11 ± 14,55)
	Ekstrak iles-iles dosis 2.000 mg/kg	6	(301,80 ± 0,00)
	Na CMC 1% (kontrol positif)	6	(260,00 ± 0,00)
	Akuades (kontrol negatif)	6	(261,20 ± 6,21)

terjadi karena mekanisme umpan balik tubuh terhadap penekanan sistem imun sehingga pemberian ekstrak tidak menunjukkan toksik.<sup>6</sup>

### Pembahasan

Pada penelitian ini, sampel uji yang dipakai ialah ekstrak etanol umbi iles-iles (*Amorphophallus*

**Arfatul Makiyah:** Uji Toksisitas Akut yang Diukur dengan Penentuan LD<sub>50</sub> Ekstrak Etanol Umbi Iles-iles (*Amorphophallus variabilis* Bl.)



**Gambar 2** Penentuan Hasil Uji Toksisitas Akut dengan *Software* AOT 425 StatPgm

*variabilis* Bl.). Umbi iles-iles tersebut merupakan hasil determinasi tanaman di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB yang menyatakan bahwa tanaman tersebut adalah *Amorphophallus variabilis* Bl. dari suku *Araceae*. Umbi Iles-iles sebagai bahan uji diambil dari perkebunan di daerah Depok dan Majalengka, Jawa Barat. Umbi yang dipilih adalah umbi iles-iles dewasa yang siap panen, kemudian dilakukan ekstraksi di laboratorium Fakultas Farmasi, Institut Teknologi Bandung (ITB). Umbi iles-iles yang masih segar diuji kadar air simplisia dan diperoleh kadar air simplisia umbi iles-iles sebesar 8,0%. Umbi iles-iles tersebut diekstraksi dengan etanol 96% mempergunakan metode maserasi. Etanol dipergunakan sebagai pelarut karena senyawa mayor dari umbi iles-iles adalah polisakarida yang merupakan glukomanan. Etanol merupakan salah satu pelarut yang baik digunakan dalam ekstraksi senyawa polifenol, selain itu juga aman jika dikonsumsi. Metode maserasi digunakan karena cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Dari 1.500 gram umbi iles-iles segar yang diekstrak, diperoleh 41,6 gram ekstrak pasta sehingga diperoleh rendemen ekstrak sebanyak 2% berat simplisia. Ekstrak pasta inilah yang digunakan untuk uji toksisitas akut.

Uji toksisitas akut ini dilaksanakan karena tanaman umbi iles-iles ini telah digunakan secara tradisional serta telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan sebagai antihepatotoksik,

yang semua itu akan memiliki manfaat yang besar bagi manusia. Dengan demikian, uji toksisitas ini perlu dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan tumbuhan tersebut. Uji toksisitas akut dalam penelitian ini menggunakan metode *up and down procedure* (UDP). Metode ini merupakan metode alternatif dalam pengujian toksisitas akut. Ketika dibanding dengan metode penentuan nilai LD<sub>50</sub> konvensional, *up and down procedure* ini menggunakan hewan yang lebih sedikit, bahkan sampai sepertiga dari jumlah hewan yang digunakan dalam metode konvensional.<sup>12</sup> Dalam analisis perbandingan dengan metode konvensional, UDP merupakan metode yang paling sederhana untuk digunakan dan menghasilkan nilai LD<sub>50</sub> yang sangat bagus dibandingkan dengan nilai LD<sub>50</sub> dari metode konvensional.<sup>13</sup> Selain itu, dalam *Hanbook non-safety clinical testing* menyebutkan bahwa WHO menyarankan untuk mempergunakan metode ini dalam pengujian toksisitas akut. Keadaan ini dikarenakan bahwa metode tersebut merupakan metode yang fleksibel dan dapat dipertimbangkan secara ekonomi, sains, dan etik. Pada penelitian ini penggunaan metode UDP dipilih uji batas dosis (*limit test*), dikarenakan ekstrak umbi iles-iles (*Amorphophallus variabilis* Bl.) tersebut telah digunakan oleh masyarakat. Dengan demikian, dapat diasumsikan bahwa ekstrak tersebut memiliki tingkat toksisitas yang rendah. Dalam penggunaan limit test ini dipilih dosis 2.000 mg/kgBB, karena dalam panduan



internasional menyarankan bahwa untuk uji toksisitas akut dengan dosis tunggal disarankan untuk menggunakan dosis teratas (*limit dose*) 2.000 mg/kgBB.<sup>14</sup> Selain itu juga dalam klasifikasi tingkatan toksik dalam GHS (*the globally harmonized system of classification and labelling of chemicals*) disebutkan bahwa di atas dosis 2.000 mg/kgBB termasuk dalam kategori toksisitas yang rendah dan sudah tidak terdapat simbol atau tanda peringatan keamanan dalam pelabelan yang perlu dicantumkan.

Pada penelitian ini digunakan tikus putih *strain* Wistar sebagai hewan percobaan karena hewan ini ekonomis, mudah didapat, dan perawatannya mudah.<sup>13</sup> *Strain* Wistar dipilih karena memiliki reproduksi yang baik dan pertumbuhan yang unggul, selain itu galur ini sudah banyak digunakan dalam penelitian berbagai bidang, seperti studi farmakologi, farmakokinetik, dan toksikologi.<sup>11</sup> Tikus putih *strain* Wistar betina yang digunakan dalam keadaan nulipara (belum pernah melahirkan) dan tidak bunting. Hewan betina digunakan karena dalam pengujian toksisitas akut menggunakan hewan jantan dan betina akan diperoleh hasil yang sama. Ketika terdapat perbedaan respons yang diberikan antara jantan dan betina, secara umum hewan betina lebih sensitif dibanding dengan jantan.<sup>12</sup>

Tikus putih *strain* Wistar yang digunakan terlebih dahulu diaklimatisasi selama 14 hari untuk proses adaptasi dengan kondisi lingkungan baru (kandang tikus putih *strain* Wistar). Selama masa aklimatisasi tersebut, tikus putih *strain* Wistar diberi makan pellet dan minum (*ad libitum*) dan ditempatkan pada kandang dengan suhu 23°C (±30).<sup>13</sup> Aklimatisasi ini dilakukan agar tikus putih *strain* Wistar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru. Pada pengujian ini, tikus putih *strain* Wistar diberikan bahan uji secara oral menggunakan sonde. Rute oral dipilih oleh karena disesuaikan dengan rute yang biasanya digunakan pada manusia dalam mengonsumsi ekstrak umbi iles-iles. Saat sampel diujikan pada tikus putih *strain* Wistar, ekstrak kering umbi iles-iles disuspensikan dengan Na CMC 1%, karena ekstrak tersebut tidak larut sempurna dalam air. Dalam *Handbook of experience* disebutkan bahwa Na CMC 1% merupakan senyawa yang tidak toksik dan tidak menimbulkan iritan. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa zat pembawa tersebut tidak berpengaruh pada pengujian toksisitas ini.

Uji toksisitas akut ini menggunakan 5 tikus putih *strain* Wistar perlakuan dan 2 tikus putih *strain* Wistar kontrol. Dalam metode UDP dengan

pengujian *limit test*, hewan yang diberikan perlakuan bahan uji maksimal 5 hewan (OECD, 2008), sedangkan digunakannya 2 tikus putih *strain* Wistar sebagai kontrol karena dalam ICCVAM (*interagency coordinating committee on the validation of alternative methods*) menyebutkan bahwa dalam penggunaan hewan kontrol sebaiknya tidak lebih dari empat hewan, tetapi minimal menggunakan dua hewan. Hal ini bertujuan untuk mengurangi penggunaan hewan yang berlebihan dalam suatu pengujian. Uji toksisitas ini dilakukan pada tikus putih *strain* Wistar perlakuan yang telah dipuasakan (tidak diberi makan) selama 3–4 jam dengan tetap diberikan minum. Dipuasakannya tikus putih *strain* Wistar tersebut bertujuan agar nantinya ketika tikus putih *strain* Wistar tersebut diberikan sampel diharapkan sampel tersebut dapat langsung kontak dengan sistem pencernaan tikus putih *strain* Wistar dan tidak terganggu oleh adanya makanan yang ada di saluran pencernaan tikus putih *strain* Wistar. Setelah diberikan ekstrak secara oral, tikus putih *strain* Wistar juga tidak diberi makan selama 1–2 jam, tetapi tetap diberi minum secara *ad libitum*. Hal ini dilakukan untuk memaksimalkan penyerapan ekstrak pada saluran pencernaan tikus putih *strain* Wistar.

Pengamatan terhadap tanda-tanda toksisitas dilakukan setiap 30 menit setelah pemberian ekstrak selama empat jam. Dalam pengamatan diperoleh bahwa hewan beraktivitas seperti hewan kontrol yang tidak diberikan ekstrak. Setelah 24 jam dan 48 jam pengujian, satu hewan tersebut tidak mati ataupun menunjukkan tanda-tanda toksisitas. Kemudian pada hari tersebut dilakukan pemberian ekstrak pada 4 tikus putih *strain* Wistar yang lain dengan perlakuan yang sama pada tikus putih *strain* Wistar sebelumnya. Kelima tikus putih *strain* Wistar perlakuan ini sampai 14 hari tidak mati ataupun menunjukkan tanda-tanda toksisitas. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa ekstrak umbi iles-iles memiliki nilai LD<sub>50</sub> lebih dari 220 mg/kgBB, yang menurut kategori GHS dosis tersebut termasuk dalam kategori 5 yang dapat dikatakan memiliki tingkat toksisitas yang rendah. Selain itu, perubahan bobot tikus putih *strain* Wistar selama 14 hari tidak terjadi perbedaan yang bermakna jika dibanding dengan tikus putih *strain* Wistar kontrol ( $p \geq 0,05$ ).

Pada hari ke-15 dilakukan pembedahan terhadap hewan coba untuk mengamati organ hewan setelah diberikan ekstrak tersebut. Hal ini dilakukan untuk mengamati patologi yang muncul pada organ hati, ginjal, dan limpa tikus putih

*strain* Wistar ketika diamati secara makroskopis akibat pemberian ekstrak etanol umbi iles-iles. Pengamatan pada organ hati, limpa, dan ginjal tikus putih *strain* Wistar tersebut dilakukan karena hati merupakan organ terbesar dan secara metabolisme paling kompleks di dalam tubuh. Organ ini terlibat dalam metabolisme zat makanan dan sebagian besar obat dan toksikan. Sementara itu, ginjal tikus putih *strain* Wistar diamati karena urine merupakan jalur utama ekskresi sebagian besar toksikan. Akibat dari hal tersebut, ginjal mempunyai volume aliran darah yang tinggi, mengkonsentrasi toksikan pada filtrat, membawa toksikan melalui sel tubulus, dan mengaktifkan toksikan tertentu.

Selain itu, limpa juga merupakan organ sasaran karena limpa merupakan salah satu organ sistem imun. Berbagai toksikan diketahui dapat menekan fungsi imun. Penekanan ini akan mengakibatkan penurunan resistensi pejamu terhadap infeksi dan penurunan kemampuan mengendalikan neoplasma dan zat asing lain.<sup>12</sup> Menurut kriteria Gleason termasuk golongan bahan "*Practically Non Toxic*" (>1.500 mg/kgBB oral tikus).<sup>12</sup>

Zat nontoksik alami dari ekstrak akuades, Na CMC 1%, dan etanol tidak menyebabkan mortalitas (kematian) hewan coba jika pemberian dosis secara oral 2.000 mg/kgBB. Umbi iles-iles yang mengandung komposisi flavonoid, alkaloid, dan polisakarida dapat direkomendasikan pada berbagai sediaan farmakologi dan kosmetik.<sup>13</sup>

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat diambil kesimpulan bahwa perubahan bobot tikus putih *strain* Wistar kontrol dan tikus putih *strain* Wistar yang diberikan perlakuan dari sebelum diberikan ekstrak dan 14 hari sesudahnya tidak terjadi perbedaan yang bermakna. ( $p \geq 0,05$ ). Nilai LD<sub>50</sub> yang didapat dari hasil uji toksisitas akut ekstrak etanol umbi iles-iles (*Amorphophallus variabilis* Bl.) yaitu lebih besar dari 2.000 mg/kgBB. Dengan demikian, dapat dikategorikan memiliki tingkat toksisitas yang rendah. Secara makroskopis, ekstrak etanol umbi iles-iles dengan dosis 2.000 mg/kgBB tidak menyebabkan kerusakan pada organ hati dan limpa tikus putih *strain* Wistar, tetapi dapat menyebabkan glomerulus mengkerut (atrofi) pada ginjal tikus putih *strain* Wistar.

#### Daftar Pustaka

1. Gupta D, Bhardwaj S. Study of acute, subacute and chronic toxicity test. IJARPB. 2012;1(2):103-29.
2. Aggarwal S, Moodley YP, Thompson PJ, Misso NL. Prostaglandin E<sub>2</sub> and cysteinyl leukotriene concentrations in sputum: association with asthma severity and eosinophilic inflammation. Clin Exp Allergy. 2010;40(1):85-93.
3. Deora PS, Mishra CK, Mavani P, Asha R, Shrivastava B, Rajesh KN. Effective alternative methods of LD<sub>50</sub> help to save number of experimental animals. J Chem Pharm Res. 2010;2(6):450-3.
4. Khan A, Rahman M, Islam MS. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of amblyone isolated from *Amorphophallus campanulatus*. Indian J Pharmacol. 2008;40(1):41-4.
5. Baratawidjaja, Garna K, Rengganis I. Sel-sel sistem imun nonspesifik, sistem fagosit makrofag. Dalam: Wachjuni, Ambara, Prasna P, Farah P, penyunting. Imunologi dasar. Edisi ke-9. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 2010. hlm. 57-90.
6. Makiyah A, Husin UA, Sadeli R. Efek imunostimulasi ekstrak etanol umbi iles-iles terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag pada tikus putih strain wistar yang diinokulasi staphylococcus aureus. MKB. 2016;48(2):68-77.
7. Franca EL, Maynie JC, Correa VC, Pereira UCR, Batalini C, Ferrari CKB, dkk. Immunomodulatory effects of herbal plants plus melatonin on human blood phagocytes. Int J Phytomed. 2010;2(4):354-62.
8. Jain S, Dixit VK, Malviya N, Ambawatia V. Antioxidant, anti inflammation and hepatoprotective activity of etanolic and aqueous extracts of *Amorphophallus campanulatus* Roxb. tubers. Acta Pol Pharm. 2009;66(4):423-8.
9. Erkekoglu P, Giray BK, Basaran N. 3R Principle and alternative toxicity testing methods. FABAD J Pharm Sci. 2011;36(1):101-17.
10. Deshmukh NS, Bagchi M, Yasmin T, Bagchi D. Safety of a novel calcium/potassium salt of (-)-hydroxycitric acid (HCA-SX): II. developmental toxicity study in rats. Toxicol Mech Methods. 2008;18(5):443-51.
11. Krysanti A, Widjanarko SB. Toksisitas subakut tepung glukomanan (*A. muelleri* Blume) terhadap SGOT dan natrium tikus Wistar secara in vivo. Jurnal Pangan dan Agroindustri. 2014;2(1):1-7.
12. Lalitha P, Sripathi SK, Jayanthi P. Acute toxicity of extracts of *Eichhornia crassipes* (MART) Solms. Asian J Pharm Clin Res. 2012;5(4):59-61.

**Arfatul Makiyah:** Uji Toksisitas Akut yang Diukur dengan Penentuan LD<sub>50</sub> Ekstrak Etanol Umbi Iles-iles (*Amorphophallus variabilis Bl.*)

13. Chaudhari SY, Nariya MB, Galib R, Prajapati PK. Acute and subchronic toxicity study of Tamra Bhasma (incinerated copper) prepared with and without Amritakarana. J Ayurveda Integr Med. 2016;7(1):23-9.