

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PERCOBAAN

1. Pengujian nilai LD₅₀

Dari pengujian yang dilakukan menggunakan dosis yang bertingkat dengan empat dosis tidak didapatkan kematian pada hewan coba dalam jangka waktu 24 jam sampai 14 hari. Hal ini menunjukkan bahwa bahan obat herbal "X" praktis tidak toksik karena dosis terbesar pemberian lebih dari 15 gram ekstrak /kgbb yaitu 16,67 gram ekstrak /kgbb.

2. Penetapan aktivitas enzim transaminase

a. Kurva kalibrasi

Dari data serapan dan nilai aktivitas pada pembuatan kurva kalibrasi, diperoleh persamaan garis untuk aktivitas ALT adalah $y = 4,902 \cdot 10^{-3} + 2,69993 \cdot 10^{-3} \cdot x$ dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,9987 (Gambar 10) dan persamaan garis untuk aktivitas AST adalah $y = 0,014 + 2,594 \cdot 10^{-3} \cdot x$ dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,9909 (Gambar 11)

b. Pengukuran aktivitas enzim transaminase

1) Aktivitas ALT plasma mencit jantan

Aktivitas rata-rata ALT mencit jantan setelah 24 jam dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $26,07 \pm 3,05$ U/l; pada kelompok II (dosis I) diperoleh $23,81 \pm 2,64$ U/l; pada kelompok III (dosis II) diperoleh $23,81 \pm 2,88$ U/l; pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $23,44 \pm 3,03$ U/l; pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $22,07 \pm 3,30$ U/l.

Aktivitas rata-rata ALT mencit jantan setelah 14 hari dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $27,85 \pm 5,41$ U/l; pada kelompok II (dosis I) diperoleh $23,56 \pm 4,93$ U/l; pada kelompok III (dosis II) diperoleh $26,96 \pm 5,37$ U/l; pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $24,41 \pm 4,44$ U/l; pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $24,52 \pm 3,99$ U/l. hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6 dan Gambar 12.

2) Aktivitas ALT plasma mencit betina

Aktivitas rata-rata ALT mencit betina setelah 24 jam dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $24,15 \pm 5,13$ U/l; pada kelompok II (dosis I) diperoleh $20,56 \pm 3,83$ U/l; pada kelompok III (dosis II) diperoleh $20,67 \pm 3,65$ U/l; pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $22,11 \pm 3,97$ U/l; pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $21,48 \pm 4,00$ U/l.

Aktivitas rata-rata ALT mencit betina setelah 14 hari dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $25,78 \pm 4,22$ U/l; pada kelompok II (dosis I) diperoleh $22,04 \pm 4,11$ U/l; pada kelompok III (dosis II) diperoleh $22,44 \pm 4,73$ U/l; pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $22,81 \pm 3,81$ U/l; pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $25,48 \pm 3,87$ U/l. hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 7 dan Gambar 13.

3) Aktivitas AST plasma mencit jantan

Aktivitas rata-rata AST mencit jantan setelah 24 jam dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $27,08 \pm 5,03$ U/l; pada kelompok II (dosis I) diperoleh $25,84 \pm 5,22$ U/l; pada kelompok III (dosis II) diperoleh $25,30 \pm 4,22$ U/l; pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $24,47 \pm 3,88$ U/l; pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $24,13 \pm 4,36$ U/l.

Aktivitas rata-rata AST mencit jantan setelah 14 hari dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $29,85 \pm 4,73$ U/l; pada kelompok II (dosis I) diperoleh $28,79 \pm 4,37$ U/l; pada kelompok III (dosis II) diperoleh $28,94 \pm 5,06$ U/l; pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $29,05 \pm 4,44$ U/l; pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $28,98 \pm 4,20$ U/l. hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 10 dan Gambar 14.

4) Aktivitas AST plasma mencit betina

Aktivitas rata-rata AST mencit betina setelah 24 jam dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $26,74 \pm 4,29$ U/l; pada kelompok II (dosis I) diperoleh $26,40 \pm 5,09$ U/l; pada kelompok III (dosis II) diperoleh $26,78 \pm 4,23$ U/l; pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $26,06 \pm 4,99$ U/l; pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $26,40 \pm 4,71$ U/l.

Aktivitas rata-rata AST mencit betina setelah 14 hari dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $26,74 \pm 4,97$ U/l; pada kelompok II (dosis I) diperoleh $27,65 \pm 4,44$ U/l; pada kelompok III (dosis II) diperoleh $26,18 \pm 4,75$ U/l; pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $24,62 \pm 4,89$ U/l; pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $25,80 \pm 4,53$ U/l. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 11 dan Gambar 15.

Berdasarkan analisa varians satu arah menunjukkan bahwa aktivitas enzim transaminase setelah 24 jam dan setelah 14 hari dari perlakuan pada mencit jantan dan betina pada kelompok I sampai V tidak berbeda secara bermakna baik antar kelompok perlakuan maupun dengan kelompok I sebagai kontrol normal (Lampiran 8 sampai 15).

3. Penetapan Kadar Urea

a. Kurva kalibrasi

Dari data serapan dan kadar pada pembuatan kurva kalibrasi, diperoleh persamaan garis untuk kadar urea plasma $y = 0,0572 + 5,976 \cdot 10^{-3}x$ dengan nilai koefisien korelasi ($r = 0,999$) (Gambar 11).

b. Pengukuran kadar urea

1) Kadar urea plasma mencit jantan

Kadar rata-rata urea mencit jantan setelah 24 jam dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $26,91 \pm 6,75$ (mg/dL); pada kelompok II (dosis I) diperoleh $26,00 \pm 6,06$ (mg/dL); pada kelompok III (dosis II) diperoleh $27,50 \pm 6,00$ (mg/dL); pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $31,77 \pm 5,11$ (mg/dL); pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $31,77 \pm 5,11$ (mg/dL).

Kadar rata-rata urea mencit jantan setelah 14 hari dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $22,91 \pm 8,70$ (mg/dL); pada kelompok II (dosis I) diperoleh $28,18 \pm 7,67$ (mg/dL); pada kelompok III (dosis II) diperoleh $23,07 \pm 5,86$ (mg/dL); pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $29,55 \pm 9,73$ (mg/dL); pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $30,93 \pm 7,72$ (mg/dL).

(mg/dL). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel 13 dan Gambar 16.

2) Kadar urea plasma mencit betina

Kadar rata-rata urea mencit betina setelah 24 jam dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $25,04 \pm 5,48$ (mg/dL); pada kelompok II (dosis I) diperoleh $24,82 \pm 6,44$ (mg/dL); pada kelompok III (dosis II) diperoleh $22,13 \pm 4,94$ (mg/dL); pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $22,13 \pm 6,23$ (mg/dL); pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $25,07 \pm 7,20$ (mg/dL).

Kadar rata-rata urea mencit betina setelah 14 hari dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $26,38 \pm 4,78$ (mg/dL); pada kelompok II (dosis I) diperoleh $28,18 \pm 7,67$ (mg/dL); pada kelompok III (dosis II) diperoleh $26,30 \pm 7,50$ (mg/dL); pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $25,77 \pm 4,49$ (mg/dL); pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $27,21 \pm 6,31$ (mg/dL). hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 14 dan Gambar 17.

Berdasarkan analisa varians satu arah menunjukkan bahwa kadar urea setelah 24 jam dan setelah 14 hari dari perlakuan pada mencit jantan dan betina pada kelompok I sampai V tidak berbeda secara bermakna baik antar kelompok

perlakuan maupun dengan kelompok I sebagai kontrol normal (Lampiran 16 sampai 19).

4. Pengukuran kadar kreatinin

1) Kadar kreatinin plasma mencit jantan

Kadar rata-rata kreatinin mencit jantan setelah 24 jam dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $0,80 \pm 0,36$ (mg/dL); pada kelompok II (dosis I) diperoleh $0,75 \pm 0,27$ (mg/dL); pada kelompok III (dosis II) diperoleh $0,72 \pm 0,28$ (mg/dL); pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $0,55 \pm 0,19$ (mg/dL); pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $0,55 \pm 0,23$ (mg/dL).

Kadar rata-rata kreatinin mencit jantan setelah 14 hari dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $0,78 \pm 0,37$ (mg/dL); pada kelompok II (dosis I) diperoleh $0,72 \pm 0,32$ (mg/dL); pada kelompok III (dosis II) diperoleh $0,63 \pm 0,26$ (mg/dL); pada kelompok IV (dosis III) diperoleh $0,63 \pm 0,33$ (mg/dL); pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $0,54 \pm 0,32$ (mg/dL). hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 15 dan Gambar 18.

2) Kadar kreatinin plasma mencit betina

Kadar rata-rata kreatinin mencit betina setelah 24 jam dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh $0,71 \pm 0,28$ (mg/dL); pada kelompok II (dosis I) diperoleh $0,51 \pm 0,22$ (mg/dL);

pada kelompok III (dosis II) diperoleh 0.70 ± 0.30 (mg/dL); pada kelompok IV (dosis III) diperoleh 0.63 ± 0.28 (mg/dL); pada kelompok V (dosis IV) diperoleh 0.75 ± 0.33 (mg/dL).

Kadar rata-rata kreatinin mencit betina setelah 14 hari dari perlakuan pada kelompok I (kontrol) diperoleh 0.67 ± 0.31 (mg/dL); pada kelompok II (dosis I) diperoleh 0.50 ± 0.18 (mg/dL); pada kelompok III (dosis II) diperoleh 0.66 ± 0.21 (mg/dL); pada kelompok IV (dosis III) diperoleh 0.48 ± 0.13 (mg/dL); pada kelompok V (dosis IV) diperoleh $0.69 \pm 0,25$ (mg/dL). hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 16 dan Gambar 19.

Berdasarkan analisa varians satu arah menunjukkan bahwa kadar kreatinin setelah 24 jam dan setelah 14 hari dari perlakuan pada mencit jantan dan betina pada kelompok I sampai V tidak berbeda secara bermakna baik antar kelompok perlakuan maupun dengan kelompok I sebagai kontrol normal (Lampiran 20 sampai 23).

B. PEMBAHASAN

Penelitian yang dilakukan diawali dengan persiapan hewan coba, yaitu mencit putih jantan dan betina galur ddY berumur lebih kurang dua bulan dengan berat badan 20 – 30 gram masing-masing 50 ekor. Mencit dipilih sebagai hewan coba daripada tikus selain harganya yang

lebih murah, pemeliharanya yang mudah dan dapat menghemat pemakaian bahan uji.

Mencit yang akan digunakan dikelompokkan berdasarkan pedoman dari WHO (27) yaitu menggunakan sepuluh ekor mencit tiap kelompok dan diaklimatisasi selama dua pekan. Aklimatisasi bertujuan agar mencit beradaptasi dengan lingkungan baru dan meminimalisir efek stress pada mencit yang dapat berpengaruh pada metabolisme sehingga dapat mengganggu penelitian. Mencit juga ditimbang beratnya secara berkala untuk mendapatkan berat badan yang ideal.

Setelah dilakukan aklimatisasi mencit diberikan perlakuan dengan memberikan bahan uji dengan dosis bertingkat dan dosis kontrol. Variasi dosis bertujuan untuk mengetahui dosis yang optimal juga hubungan antara besarnya variasi dosis dan pengaruhnya terhadap fungsi hati dan ginjal mencit putih. Pengujian nilai LD₅₀ menggunakan dosis berturut-turut 2,08; 4,17; 8,34 dan 16,67 gram ekstrak/kgbb. Dosis kontrol yang digunakan adalah CMC 1%.

Penggunaan ekstrak sebagai bahan obat memiliki peran untuk meminimalkan jumlah obat yang dikonsumsi dibandingkan dengan mengkonsumsi tumbuhan asalnya, karena pada ekstrak terdapat bahan aktif yang juga terdapat pada tumbuhan segar atau herba.

CMC digunakan sebagai *Suspending agent* karena ekstrak tidak larut didalam air, CMC dipilih sebagai *suspending agent* dibandingkan *suspending agent* yang lain seperti tragakan dan gom arab,

karena tragakan memiliki efek samping berupa hipersensitivitas hewan coba, sedangkan gom arab bersifat oksidator, sehingga dapat mengoksidasi bahan uji.

Pengujian nilai LD₅₀ dengan mengamati kematian pada mencit yang terjadi selama 24 jam sesuai pedoman dari Depkes RI, dan dilakukan pengambilan darah melalui ekor, pengambilan darah melalui ekor harus dilakukan dengan hati-hati karena pengambilan melalui jalur ini mudah menimbulkan lisis terutama jika dilakukan pemijitan terhadap ekor.

Pengambilan darah pada mencit dapat dilakukan melalui mata dan ekor, tetapi pengambilan darah melalui ekor dipilih karena mencit mudah mati jika dilakukan pengambilan darah melalui mata sehingga tidak bisa dilakukan pengukuran kadar dan aktivitas pada hari ke empat belas.

Setelah didapatkan darah, sebanyak 50 µL darah dicampurkan ke dalam larutan TCA 5% sebanyak 1 mL untuk pengukuran urea dan sisanya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama lima menit untuk mendapatkan plasma.

Pengukuran dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian bahan uji terhadap fungsi hati dan ginjal. Pada fungsi hati diwakili oleh pengukuran aktivitas enzim transaminase yaitu ALT (alanin amino transferase) dan AST (aspartat amino transferase) dan fungsi ginjal diwakili oleh pengukuran urea plasma dan kreatinin plasma.

Hati merupakan kelenjar terbesar dalam tubuh, rata-rata sekitar 1.500 gram atau 2,5 % berat badan pada orang dewasa normal (13). Hati memiliki fungsi yang sangat penting dan berperan hampir dalam setiap fungsi metabolik tubuh dan salah satu fungsi yang penting adalah fungsi detoksifikasi. Hati bertanggung jawab terhadap biotransformasi zat-zat berbahaya, misalnya obat, menjadi zat-zat yang tidak berbahaya yang kemudian diekskresikan oleh ginjal (3). dengan fungsinya tersebut hati sangat mudah untuk terkontaminasi zat-zat berbahaya.

Alasan dari pemilihan enzim transaminase yaitu AST dan ALT dalam pengukuran fungsi hati adalah karena enzim ini merupakan enzim-enzim intra seluler yang terutama berada di jantung, hati dan jaringan skelet, terlepas dari jaringan yang rusak (seperti nekrosis atau terjadinya perubahan permeabilitas sel) dan aktivitasnya meningkat pada kerusakan sel hati (11).

Kelainan yang paling dini yang dapat dideteksi pada hepatitis adalah peningkatan kadar AST dan ALT, yang mendahului awitan ikterus seminggu atau dua minggu setelah terserang virus (11).

AST dan ALT merupakan enzim yang spesifik untuk melihat kondisi normal hati, sehingga terjadinya peningkatan kadar enzim di darah merupakan parameter adanya kerusakan hati (4).

Pengukuran kedua enzim transaminase menggunakan metode kolorimetri. Prinsip pengukuran aktivitas ALT adalah katalisasi yang dilakukan oleh enzim alanin aminotransferase pada proses pemindahan

gugus amino dari alanin ke asam α ketoglutarat, sehingga terbentuk senyawa piruvat dan glutamat (16).

Prinsip pengukuran aktivitas AST adalah katalisasi transfer gugus L-aspartat kepada asam α ketoglutarat oleh enzim aspartat aminotransferase sehingga terbentuk senyawa oksaloasetat dan glutamat (16). Senyawa oksaloasetat merupakan senyawa yang tidak stabil, oksaloasetat akan melepaskan gugus karboksilat membentuk asam piruvat.

Senyawa piruvat yang terbentuk dari kedua reaksi diatas direaksikan dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin membentuk sebuah kompleks yang akan memiliki warna dalam keadaan basa. Warna yang ditimbulkan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 505 nm.

Pada pengukuran aktivitas enzim transaminase, blanko uji direaksikan dengan larutan plasma setelah tahap inkubasi, hal ini bertujuan untuk mereaksikan piruvat dan zat lain yang memiliki gugus keton yang sudah terdapat di dalam plasma yang dapat membentuk kompleks dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin, sehingga dari hasil pengukuran akan didapatkan selisih asam piruvat yang berikatan dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin antara tabung blanko dan uji,

Ginjal memiliki fungsi spesifik (yang sebagian besar ditujukan untuk mempertahankan kesetabilan lingkungan cairan internal) (3), satu diantara fungsi ginjal adalah mengekskresikan (eliminasi) produk-produk

sisa (buangan) dari metabolisme tubuh, misalnya urea, asam urat dan kreatinin. Jika dibiarkan menumpuk, zat-zat sisa tersebut bersifat toksik, terutama bagi otak. Dan Mengekskresikan banyak senyawa asing, misalnya obat, zat penambah pada makanan, pestisida, dan bahan-bahan eksogen non nutrisi lainnya yang berhasil masuk ke dalam tubuh sehingga ginjal sangat mudah untuk terkontaminasi dan mengalami kerusakan akibat zat asing yang berbahaya (3).

Salah satu parameter spesifik pengukuran fungsi ginjal adalah dengan mengukur kadar kreatinin dan urea plasma. Kreatinin plasma merupakan indikator kuat bagi fungsi ginjal, peningkatan kadar dua kali lipat dari kadar plasma normal menunjukkan penurunan fungsi ginjal sebesar 50%. Demikian juga peningkatan kadar kreatinin plasma sebesar tiga kali lipat menunjukkan kerusakan ginjal sebesar 75% (4).

Pengukuran kadar kreatinin menggunakan metode Jaffe yang dimodifikasi, metode ini dipilih karena spesifik, akurat dan mudah dilakukan. Prinsip reaksi pada pengukuran kadar kreatinin yaitu kreatinin akan membentuk kompleks kreatinin pikrat berwarna kuning jingga dalam larutan alkalis pikrat (Gambar 9). Jumlah kreatinin yang di ekskresi menggambarkan fungsi masa otot dan tidak dipengaruhi oleh makanan, umur, jenis kelamin dan latihan (20,22)

Peningkatan kadar urea merupakan salah satu yang diidentifikasi pada pasien gagal ginjal berat dengan melakukan

pengukuran kadar nitrogen urea darah. Apabila fungsi ginjal terganggu maka konsentrasi urea dalam plasma meningkat (3).

Pengukuran kadar urea plasma dilakukan dengan menggunakan metode fearon atau non enzimatis. Metode ini lebih sederhana, cukup spesifik dan lebih umum digunakan dibandingkan dengan metode enzimatis.

Sebelum dilakukan pengukuran sebanyak 50 μ L darah dicampurkan dengan 1 mL TCA 5% hal ini bertujuan untuk mengendapkan protein sehingga protein yang memiliki gugus yang mirip dengan urea tidak ikut bereaksi dalam pengukuran.

Prinsip dari pengukuran urea plasma adalah dalam suasana asam, diasetil monoksim akan terhidrolisis menjadi diasetil dan hidroksil amin. Diasetil ini akan bereaksi dengan urea dan dengan katalisator kation akan membentuk senyawa turunan diazin yang menghasilkan warna dan cahaya yang terserap akan terbaca dalam bentuk serapan pada spektrofotometer pada panjang gelombang 525 nm (22,23). Penambahan tiosemikarbazid dan ferri klorida pada reaksi, akan meningkatkan intensitas warna yang terbentuk dan mengurangi kepekaan senyawa turunan diazin terhadap cahaya. Reaksi pembentukan senyawa diazin berjalan lambat sehingga dibutuhkan pemanasan pada penangas air mendidih (21,22,23).

Dari hasil pengukuran tersebut didapatkan data yang kemudian dilakukan pengujian menggunakan uji distribusi normal (Uji *kolmogorov-*

smirnov), Uji homogenitas (Uji *levene*) dan uji ANAVA untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan secara bermakna dari aktivitas dan kadar antar kelompok perlakuan.

Pada pengujian ANAVA dengan $\alpha = 0,05$ terhadap aktivitas enzim transaminase, urea plasma dan kreatinin plasma mencit putih jantan dan betina 24 jam dan 14 hari dari pengukuran menunjukkan bahwa pada kelima kelompok percobaan tidak ada perbedaan secara bermakna pada parameter-parameter yang dilakukan pengukuran baik antar kelompok perlakuan maupun dengan kelompok kontrol normal. Hal ini menandakan tidak ada kenaikan atau penurunan aktivitas dan kadar secara bermakna dibandingkan dengan kelompok normal.

Secara umum tanaman obat memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan obat-obatan sintetik bila digunakan dalam dosis dan cara penggunaan yang benar. Satu tanaman dapat menghasilkan beberapa metabolit sekunder yang berupa zat aktif sehingga memungkinkan dalam satu tanaman obat memiliki beberapa efek farmakologis. Tanaman obat memiliki efek samping yang lebih rendah karena di dalam tanaman obat terdapat suatu mekanisme yang dapat menetralkan efek samping yang dikenal dengan SEES (*Side Effect Eliminating Substance*).

Pada penelitian yang dilakukan terhadap bahan obat baru yaitu bahan obat "X" yang merupakan ekstrak daun sukun yang terdiri dari flavonoid sebanyak 30%. Diketahui bahwa bahan obat herbal tersebut

praktis tidak toksik dan aman terhadap fungsi hati dan ginjal mencit putih jantan dan betina yang telah diberikan bahan obat herbal dengan dosis yang bertingkat.

