

Acute toxicity test ethanol extract of kerehau leaf (*Callicarpa longifolia* Lamk) using OECD 420 method

Uji toksisitas akut ekstrak etanol daun kerehau (*Callicarpa longifolia* Lamk) dengan metode OECD 420

Aulia Nurfazri, Shintya Safitri, Elis Susilawati*

Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana, Jawa Barat, Indonesia

*Corresponding author: elis.susilawati@bku.ac.id

Abstract

Background: Kerehau is empirically used as cooling powder to treat acne. Based on previous research, kerehau leaves have a number of activities, including wound healing, antidiabetic, and anti-inflammatory.

Objectives: This study aimed to determine the safety level of a single dose of ethanol extract of kerehau leaves within a 24-hour administration period.

Methods: Acute toxicity testing of ethanol extract of kerehau leaves was carried out on female Webster mice. Test animals were divided into 4 treatment groups, consisting of 1 control group and 3 test groups. The testing method referred to OECD (Organization of Economic Cooperation and Development) 420 with modified doses of 2000mg/kgBW, 5000 mg/kgBW, and 8000 mg/kgBW. The observations were made on the behaviour of animals towards toxicity symptoms for 4 hours after administration of the test substance as well as death. The death and weight gain were observed for 14 days. On the 15th day, animals were sacrificed, blood was taken, and biochemical parameters were measured. The heart, kidneys, liver, spleen, and lungs were harvested and weighed. Data was analysed using Oneway ANOVA continued with LSD and Post Hoc.

Results: The results showed that ethanol extract of kerehau leaves did not cause death in all of the groups. There were significant differences in liver weight, SGPT, and SGOT levels ($p < 0.05$) at the dose of 5000 mg/kgBW. No toxicity symptoms and death were found until the end of the experiment.

Conclusion: LD₅₀ value of ethanol extract of kerehau leaves was above 8000 mg/kgBW with heart as the most affected organ.

Keywords: Ethanol extract of kerehau leaves, acute toxicity test, OECD 420.

Intisari

Latar Belakang: Tanaman kerehau secara empiris digunakan sebagai bedak dingin untuk menghilangkan jerawat. Berdasarkan penelitian sebelumnya daun kerehau memiliki beberapa aktivitas sebagai penyembuh luka, antidiabetes dan antiinflamasi.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk menentukan tingkat keamanan dosis tunggal ekstrak etanol daun kerehau dalam jangka waktu pemberian 24 jam.

Metode : Pengujian toksisitas akut ekstrak etanol daun kerehau dilakukan terhadap mencit Webster betina. Hewan uji dikelompokkan menjadi 4 kelompok perlakuan, yang terdiri dari 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok uji. Metode pengujian dilakukan merujuk pada OECD (Organization of Economic Cooperation and Development) 420 dengan modifikasi dosis yaitu 2000mg/kgBB, 5000 mg/kgBB dan 8000 mg/kgBB. Pengamatan yang dilakukan meliputi pengamatan perilaku hewan uji terhadap gejala toksik selama 4 jam setelah pemberian sediaan uji, serta adanya kematian. Kematian dan peningkatan berat badan diamati selama 14 hari. Pada hari ke-15 hewan dikorbankan dan dilakukan pengambilan darah dan diukur parameter biokimianya. Organ jantung, ginjal, hati, limpa dan paru-paru diambil dan

ditimbang. Analisis data menggunakan Oneway ANOVA dilanjutkan dengan LSD dan Post Hoc.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kerehau tidak menimbulkan kematian pada semua kelompok pengujian. Terdapat perbedaan bermakna terhadap berat organ hati, kadar SGPT dan SGOT ($p < 0,05$) pada dosis 5000 mg/kgBB. Tidak terjadi gejala toksik dan kematian hingga akhir pengujian.

Kesimpulan: Nilai LD₅₀ ekstrak etanol daun kerehau di atas dosis 8000 mg/kgBB dengan organ sasaran yang dipengaruhi yakni hati.

Kata kunci: Ekstrak etanol daun kerehau, uji toksisitas akut, OECD 420

1. Pendahuluan

Tanaman kerehau (*Callicarpa longifolia* Lamk) merupakan tanaman yang berasal dari Kalimantan Timur, berbentuk semak atau pohon kecil yang secara empiris dimanfaatkan sebagai bedak dingin untuk menghilangkan bekas jerawat, radang, obat diare dan obat masuk angin (Supomo *et al.*, 2016). Gel ekstrak etanol daun kerehau (*Callicarpa longifolia* Lamk) terbukti dapat menyembuhkan luka pada kelinci (Susilawati, Aligita, *et al.*, 2018). Ekstrak etanol daun kerehau dapat menurunkan kadar glukosa darah pada hewan diabetes yang diinduksi makanan tinggi lemak dan berpengaruh pada kadar malondialdehid mencit yang diinduksi aloksan (Susilawati, Selifiana, *et al.*, 2018). Dengan beberapa hasil penelitian tersebut, uji toksisitas akut sangat perlu dilakukan untuk mengukur derajat efek toksik suatu senyawa dalam waktu tertentu setelah pemberian dosis tunggal. Aspek toksikologi masih belum banyak diketahui dan dilakukan dari pemakaian bahan pangan maupun obat dari tanaman yang dikarenakan alasan penggunaan yang sudah turun menurun, sehingga harus mulai beralih ke penelitian toksikologi karena semakin banyaknya bahan-bahan natural yang dimanfaatkan untuk pengobatan (Lee *et al.*, 2003).

Penelitian uji toksisitas akut daun kerehau sebelumnya telah dilakukan dengan pengamatan perilaku aktivitas mencit secara umum (Siswanto *et al.*, 2017). Keterbaruan penelitian ini dengan menambahkan data pengukuran kadar SGPT, SGOT, kreatinin, indeks organ jantung, ginjal, hati, limpa dan paru-paru, sehingga organ sasaran ekstrak etanol daun kerehau dapat diketahui dengan jelas. Selain itu, pada penelitian ini juga dilakukannya modifikasi dosis dari penelitian sebelumnya.

2. Metode penelitian

2.1 Alat

Seperangkat alat gelas dan maserasi, *rotary evaporator*, seperangkat alat bedah hewan dan Microlab 300 (Elitech MRK®).

2.2 Bahan

Simplisia daun kerehau (*Callicarpa longifolia* Lamk) diperoleh dari desa Tumbang Lahang, Kalimantan Tengah, etanol 96% (Brataco®), Na-CMC, HCl, NaOH, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorf, eter, magnesium, pereaksi Lieberman-Bouchard, pereaksi Bouchardat, besi (III) klorida, asam asetat, metanol, etil asetat, akuades, serbuk Mg, NaCl, amil alkohol, reagen SGPT, SGOT dan kreatinin (Proline®).

2.3 Hewan uji

Mencit betina galur Swiss Webster betina (Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana) berumur 6-8 minggu dengan bobot berkisar 20-30 gram yang sehat dan memiliki aktivitas normal (Kode etik No.285/UN6.KEP/EC/2019).

2.4 Prosedur penelitian

1.4.1 Pembuatan ekstrak etanol daun kerehau (*Callicarpa longifolia* Lamk)

Daun kerehau segar sebanyak 10 kg dicuci bersih dan dikeringkan didapat 2,8 kg simplisia kering, kemudian diserbuk menggunakan *chopper* lalu dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Peredaman dilakukan selama 3 hari dengan 3 kali pengulangan. Maserat dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator*.

1.4.2 Skrining fitokimia

Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi identifikasi alkaloid, saponin, tannin, terpenoid, kuinon dan flavonoid (Harborne *et al.*, 1996).

1.4.3 Karakterisasi simplisia

Proses karakterisasi simplisia meliputi pengujian makroskopik, susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, dan kadar sari larut etanol.

1.4.4 Perlakuan hewan uji

Metode yang digunakan pada pengujian toksisitas akut ini diadaptasi dari pedoman pengujian toksisitas akut OECD 420 dimana hewan uji yang digunakan yaitu mencit putih betina galur Swiss Webster (OECD, 2001). Sebanyak 20 ekor mencit dengan bobot 20-30 gram selanjutnya diaklimatisasi selama 7 hari sebelum dilakukan pengujian. Kemudian mencit dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing 5 ekor yang terdiri dari kelompok 1 kontrol negatif diberikan Na-CMC 1%, kelompok II diberikan ekstrak etanol daun kerehau dosis 2000 mg/kgBB, kelompok IV diberikan ekstrak etanol daun kerehau dosis 5000 mg/kgBB dan kelompok II diberikan ekstrak etanol daun kerehau dosis 8000 mg/kgBB. Pemberiaan sediaan uji dilakukan satu kali (dosis tunggal). Penelitian dilakukan selama 14 hari. Pengamatan yang dilakukan yaitu profil perubahan berat badan, indeks berat organ dan pemeriksaan biokimia menggunakan serum (kadar SGPT, SGOT dan kreatinin) (Al-Afifi *et al.*, 2018). Pada hari ke 14, semua hewan dikorbankan untuk mengetahui organ sasaran toksik yang dipengaruhi oleh ekstrak etanol daun kerehau (EEDK). Hewan uji dikorbankan dengan cara dislokasi leher, kemudian organ hati, ginjal, jantung, limpa dan paru-paru dikeluarkan dengan cara menyayat bagian tengah perut

mencit (Al-Afifi *et al.*, 2018). Organ segar yang telah diisolasi, dibersihkan dari lemak yang menempel kemudian dicuci dengan larutan NaCl 0,9% sebelum ditimbang agar diperoleh berat organ yang tepat. Indeks berat organ dihitung dengan perhitungan Jothy *et al.*, 2011:

$$\text{Indeks organ} = (\text{berat organ} \times 100) / (\text{berat badan})$$

2.5 Analisis data

Data dianalisis secara statistik dengan menggunakan analisis varian (ANOVA) *One way* dan dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Different*) dan analisis *Post Hoc* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan antar kelompok uji (signifikansi: 95%).

3. Hasil dan pembahasan

Berdasarkan hasil ekstraksi dari serbuk kering daun kerehau 2,8 kg, menghasilkan rendemen sebesar 14,16%. Karakterisasi simplisia dilakukan untuk mengetahui kualitas dan mutu dari simplisia yang digunakan dengan hasil karakterisasi dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil karakterisasi simplisia daun kerehau

Jenis karakterisasi	Hasil (%)
Kadar sari larut air	15,2
Kadar sari larut etanol	17,92
Kadar abu total	6,75
Kadar abu larut tidak asam	0,75
Susut pengeringan	8,19

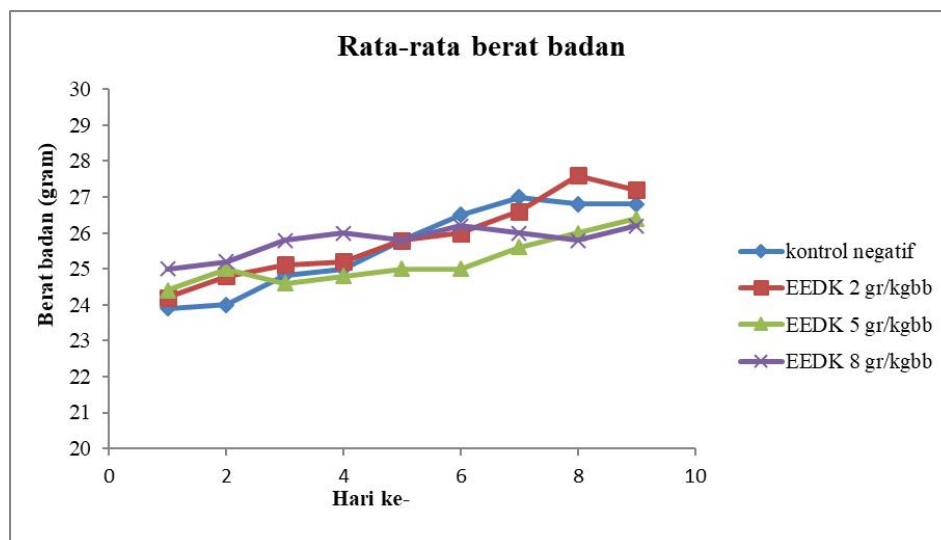
Skrining fitokimia dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak etanol daun kerehau. Hal ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dan untuk memastikan kembali bahwa selama proses penguapan pelarut tidak ada senyawa yang hilang atau ikut menguap. Hasil skrining fitokimia terhadap simplisia dan ekstrak etanol daun kerehau dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia daun kerehau

No.	Metabolit sekunder	Hasil	
		Ekstrak	Simplisia
1.	Alkaloid	-	-
2.	Flavonoid	+	+
3.	Tanin	+	+
4.	Saponin	+	+
5.	Kuinon	+	+
6.	Steroid/triterpenoid	+	+

Berdasarkan Gambar 1, tidak terjadi penurunan berat badan yang signifikan. Penurunan berat badan yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol dapat menjadi tanda adanya gejala toksik, penyakit atau pertanda kesehatan yang buruk. Perubahan berat badan merupakan indikator dari efek samping bahan kimia jika terjadi penurunan lebih dari 10 % berat badan awal (Jothy *et al.*, 2011). Selain itu, kehilangan berat badan lebih dari 20%

merupakan efek samping yang merugikan dan dianggap kritis dalam beberapa pedoman internasional (Al-Afifi *et al.*, 2018).



Gambar 1. Profil perubahan berat badan setelah pemberian ekstrak etanol daun Kerehau

Pada tabel 3 dapat dilihat bahwa perbedaan bermakna untuk berat organ antar kelompok perlakuan dengan kontrol negatif, hanya didapatkan pada organ hati ($p < 0,05$). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa EEDK mempengaruhi organ hati, di mana indeks berat organ hati pada kelompok kontrol negatif lebih besar dibanding dengan kelompok uji. Hal ini dikaitkan dengan peran hati dalam aktivitas metabolik tubuh. Kerusakan organ hati diawali dengan terjadinya perubahan morfologi dan fisiologi sel hati yang mengalami cedera dengan peningkatan penyerapan air, kemudian menyebar hingga organel dan sitoplasma. Hal tersebut menyebabkan pembengkakan sel, ditandai dengan peningkatan volume dan ukuran sel (Zachary & McGavin, 2014).

Indeks organ hati, limpa dan paru-paru pada EEDK 2000 mg/kgBB lebih besar dibandingkan EEDK 5000mg/kgBB dan 8000 mg/kgBB walaupun tidak signifikan ($p < 0,05$). Hal tersebut diduga terjadi karena adanya peningkatan berat badan yang cukup besar pada EEDK 2000 mg/kgBB. Pemberian dosis tersebut juga dapat meningkatkan nafsu makan yang berbanding lurus dengan peningkatan berat badan dan berat organ.

Hasil parameter biokimiawi pada serum ditunjukkan pada tabel 4. Peningkatan kadar SGPT menunjukkan disfungsi hepar sebagai akibat dari biosintesis enzim dan penurunan permeabilitas membran. Kerusakan hepar yang terjadi kemungkinan karena paparan langsung zat toksik pada saat proses detoksifikasi produk metabolit dan senyawa xenobiotik (Mandasari *et al.*, 2015). Berdasarkan analisis statistik Oneway ANOVA terhadap kadar SGPT dan SGOT, menunjukkan bahwa perbedaan bermakna antara seluruh kelompok perlakuan dengan kontrol negatif pada kadar SGPT ($p < 0,05$). Adapun untuk SGOT, perbedaan bermakna hanya pada dosis 5000 mg/kgBB ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa EEDK diduga dapat menurunkan kadar

SGOT dan SGPT secara bersamaan pada dosis 5000 mg/kgBB yang dapat dijadikan sebagai hepatoprotektor.

Tabel 3. Indeks organ setelah pemberian ekstrak etanol daun kerehau

Kelompok	Indeks Organ (gram)				
	Jantung	Ginjal	Hati	Limpa	Paru-paru
Kontrol negatif	0,62±0,06	1,10±0,15	6,44±1,07	0,95±0,31	1,02±0,13
EEDK 2000mg/kgBB	0,56±0,08	1,10±0,06	5,76±0,57	1,31±0,57	1,04±0,14
EEDK 5000mg/kgBB	0,56±0,05	1,17±0,19	5,03±0,49*	0,91±0,25	0,96±0,97
EEDK 8000mg/kgBB	0,58±0,13	0,96±0,11	5,21±0,62*	0,86±0,28	0,87±0,09

Keterangan: *Berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$)

Tabel 4. Parameter biokimiawi darah setelah pemberian ekstrak etanol daun kerehau

Kelompok	SGPT (mg/dL)	SGOT (mg/dL)	Kreatinin (mg/dL)
Kontrol negatif	75,32±15,03	140,10±39,89	0,26±0,07
EEDK 2000mg/kgBB	42,60±12,36*	151,48±22,97	0,28±0,09
EEDK 5000mg/kgBB	39,56±28,38*	94,38±43,75*	0,33±0,13
EEDK 8000mg/kgBB	48,00±11,75*	105,06±14,43	0,33±0,07

Keterangan: *Berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$)

Gejala toksik tidak terjadi pada semua kelompok pengujian setelah pemberian sediaan uji. Hingga akhir pengujian, tidak terjadi kematian dan gejala toksik lainnya baik pada kelompok uji 2000 mg/kgBB, 5000 mg/kgBB, 8000mg/kgBB, maupun kontrol negatif. Berdasarkan pengamatan tersebut dapat dikatakan bahwa LD₅₀ EEDK di atas dosis 8000mg/kgbb.

4.Kesimpulan

Nilai LD₅₀ ekstrak etanol daun kerehau di atas dosis 8000 mg/kgBB dengan organ sasaran yang dipengaruhi yakni hati.

Ucapan terima kasih

Terimakasih kepada Lembaga Pusat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat dan Fakultas Farmasi Universitas Bhakti kencana yang telah membiayai dan memfasilitasi penelitian ini.

Daftar pustaka

- Al-Afifi, N. A., Alabsi, A. M., Bakri, M. M., & Ramanathan, A. (2018). Acute and sub-acute oral toxicity of *Dracaena cinnabari* resin methanol extract in rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 50-50. doi:10.1186/s12906-018-2110-3
- Harborne, J. B., Sudiro, I., Padmawinata, K., & Niksolihin, S. (1996). *Metode fitokimia: penuntun cara modern menganalisis tumbuhan* (S. Niksolihin Ed.): Penerbit ITB.

- Jothy, S. L., Zakaria, Z., Chen, Y., Lau, Y. L., Latha, L. Y., & Sasidharan, S. (2011). Acute oral toxicity of methanolic seed extract of *Cassia fistula* in mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(6), 5268-5282. doi:10.3390/molecules16065268
- Lee, J. E., Kim, H. j., Lee, C. H., Lee, K. C., Choi, E. K., Chai, H. Y., Yun, Y. W., Kim, D. J., Nam, S. Y., Lee, B. J., & Ahn, B. W. (2003). Four-week repeated-dose toxicity study on *Pinellia* Extract. *Korean J. Lab. Anim. Sci.*, 19, 127-141.
- Mandasari, A. A., Wahyuningsih, S. P. A., & Darmanto, W. (2015). Uji toksisitas akut polisakarida krestin dari ekstrak *coriolus versicolor* dengan parameter kerusakan hepatosit, enzim SGPT dan SGOT pada mencit. *Jurnal Sain Veteriner*, 33(1).
- OECD. (2001). Acute oral toxicity-fixed dose procedure. In (Vol. 420, pp. 14): OECD.
- Siswanto, E., Sari, D. N. I., & Supomo, S. (2017). Uji toksisitas akut ekstrak etanol daun kerehau (*Callicarpa longifolia* Lam.) terhadap mencit putih *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 1(2), 127-132.
- Supomo, S., Supriningrum, R., & Junaid, R. (2016). Karakterisasi dan dkrining fitokimia daun kerehau (*Callicarpa longifolia* Lamk.). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 13(2).
- Susilawati, E., Aligita, W., Adnyana, I. K., Hasimun, P., Sukmawati, I. K., & Anneesha, P. (2018). Activity of karehau (*Callicarpa longifolia* lamk.) leaves ethanolic extract as a wound healing. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10, 1243-1247.
- Susilawati, E., Selifiana, N., Aligita, W., Betharia, C., & Fionna, E. (2018). Aktivitas antidiabetes ekstrak eatnol daun kerehau (*Callicarpa longifolia* Lamk.). *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-ilmu Keperawatan, Analisis Kesehatan dan Farmasi*, 18. doi:10.36465/jkbth.v18i2.398
- Zachary, J. F., & McGavin, M. D. (2014). *Pathologic basis of veterinary disease* (5th ed.). Missouri: Elsevier Mosby.