

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian Uji Toksisitas Ekstrak Biji *C. moschata* telah selesai dilakukan. Biji labu kuning yang digunakan adalah biji yang sudah tua, memiliki cangkang yang keras, berbentuk lonjong dan berwarna kecoklatan. Untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan, langkah awal yang dilakukan adalah determinasi tanaman. Determinasi tanaman ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada. Determinasi dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada biji labu kuning. Biji labu kuning (*C. moschata*) diperoleh dari perkebunan daerah Purwodadi yang sudah melalui proses pengeringan dan sortasi. Proses pengeringan dilakukan supaya biji tidak mudah rusak dan dapat disimpan dalam waktu yang lama. Sortasi dilakukan untuk memperoleh biji yang bersih dengan menghilangkan kotoran ataupun benda asing yang menempel pada biji.

Biji yang sudah disortasi kemudian diblender untuk mendapatkan serbuk dengan ukuran yang kecil. Hal ini dilakukan untuk memperluas kontak antara serbuk biji *C. moschata* dengan pelarut sehingga senyawa yang ditarik dapat terlarut dengan sempurna. Rangkaian proses ekstraksi dimulai dari pembuatan serbuk simplisia, pemilihan metode ekstraksi, pemilihan cairan pelarut, separasi atau pemurnian, pemekatan atau penguapan menggunakan evaporasi, pengeringan ekstrak dan rendemen. Dari sejumlah 100 gram biji *C. moschata* diperoleh 900 gram serbuk yang siap untuk diekstraksi.

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Maserasi merupakan proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut yang sesuai dengan beberapa kali pengadukan pada temperature suhu ruangan (Depkes RI, 2000). Metode ini dapat menghindari kerusakan senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani, 2014). Keuntungan utama metode ekstraksi maserasi yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, metode ekstraksi maserasi tidak dipanaskan sehingga bahan alam tidak menjadi terurai. Pelarut yang digunakan adalah etanol yang bersifat polar, universal dan mampu melarutkan hampir semua zat (Arifin dkk, 2006). Maserasi dilakukan selama lima hari, diawali dengan merendam serbuk *C. moschata* sejumlah 900 gram ke dalam 6750 ml etanol. Kemudian dilakukan remaserasi untuk menyari senyawa yang masih tertinggal atau tidak tersari pada proses maserasi. Rendaman sesekali diaduk agar maserat dapat homogen dan komponen senyawa aktif tertarik secara merata (Voight, 1994). Pengadukan berulang-ulang dilakukan untuk menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat dalam cairan. Ekstrak cair yang didapatkan kemudian dievaporasi menggunakan *Rotary Evaporator* dengan kecepatan 90 rpm pada suhu 50°C. Proses evaporasi bertujuan untuk menguapkan pelarut etanol sampai ekstrak menjadi kental atau pekat dengan tanpa disertai kandungan etanol itu sendiri. Etanol merupakan salah satu senyawa yang dapat menyebabkan ketoksikan dalam tubuh sehingga dilakukan uji kadar etanol pada ekstrak dengan menggunakan metode kromatografi gas yang dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian UGM. Hasil uji kadar etanol

dalam ekstrak biji labu kuning menunjukkan kadar 0,10%, sehingga ekstrak biji *C. moschata* termasuk dalam kategori aman. Sekitar 20% etanol dapat diserap oleh lambung secara cepat. Pada konsentrasi 5 – 10% etanol memblok kemampuan neuron dalam impuls listrik. Ekstrak kental yang didapatkan dari serangkaian proses ekstraksi adalah sebanyak 54,8 gram . Sehingga diperoleh rendemen (perbandingan ekstrak) sebesar 6,08% dengan perhitungan yang ditunjukkan pada Lampiran 3. Nilai rendemen total akan menentukan lama ekstraksi yang optimal dan menunjukkan mutu ekstrak yang terbaik (Kristian dkk, 2016). Irawan (2010) menyebutkan bahwa waktu ekstraksi yang pendek akan memberikan hasil yang rendah dikarenakan semua komponen tidak terekstrak.

Pada penelitian ini uji toksisitas biji *C. moschata* menggunakan mencit Balb/C sebagai subjek penelitian. Jumlah mencit yang digunakan adalah 64 ekor mencit yang terbagi menjadi dua jenis uji toksisitas yaitu uji toksisitas akut dan uji toksisitas subkronis. Sebelum mendapatkan perlakuan, 64 ekor mencit di aklimatisasi terlebih dahulu untuk beradaptasi terhadap lingkungan.

a. Uji Toksisitas akut

Uji Toksisitas akut bertujuan untuk mengetahui dampak efek toksik yang timbul dalam waktu 24 jam setelah pemberian dosis tunggal zat uji secara per oral. Hewan uji yang digunakan untuk uji toksisitas akut sejumlah 50 ekor mencit Balb/C yang terbagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol, Ekstrak *C. moschata* (ECM) 300 mg/kgBB, ECM 2000 mg/kgBB, ECM 7500 mg/kgBB dan ECM 15000 mg/kgBB. Pembagian dosis tersebut sesuai dengan rentang kriteria

toksik Loomis pada Tabel 1, dimana kriteria penggolongan sediaan uji dengan LD50 oral sebesar 5000 sampai dengan 15000 mg/kgBB diklasifikasikan sebagai sediaan yang “Praktis Tidak Toksik” (BPOM, 2014). Dosis tersebut setelah dikonversikan kepada manusia dalam Lampiran 4 didapatkan dosis sebesar 33,25 mg/kgBB; 221,65 mg/kgBB; 13671,28 mg/kgBB; dan 1662,42 mg/kgBB.

Pengamatan yang dilakukan pada uji toksisitas subakut berupa perubahan gejala ataupun perilaku mencit yang telah diberikan zat uji dosis tunggal secara peroral selama 24 jam. Terdapat 5 kriteria pengamatan perubahan yang dipilih dari beberapa kriteria Loomis untuk diamati. Kriteria pengamatan tersebut meliputi :

1. Aktivitas mencit yaitu pada aktivitas lokomotor atau pergerakan mencit yang meningkat atau bahkan menurun serta melompat-lompat. Gerak lokomotor diartikan sebagai gerak memindahkan tubuh dari satu tempat ke tempat lain contohnya adalah berjalan, berlaki, memanjat dan lain-lain (Mughtaridi, 2008).
2. Reaksi yang aneh yang meliputi reaksi mencit yang berkeliling tanpa arah, menyeruduk serta gerakan berputar-putar
3. Ekor yang abnormal yang meliputi ekor kaku atau lemas
4. Sianosis yaitu gejala fisik berupa tanda kebiruan pada kulit dan selaput lender seperti pada mulut atau bibir akibat rendahnya kadar oksigen dalam darah
5. Kematian.

Secara keseluruhan hasil dari pengamatan perubahan perilaku yang telah dilakukan dalam 24 jam menunjukkan tidak adanya perubahan perilaku yang terjadi pada setiap mencit. Pengamatan tersebut terangkum dengan menunjukkan jumlah mencit yang mengalami perubahan dalam Tabel 6.

Tabel 6. Jumlah mencit yang mengalami perubahan perilaku

| Gejala atau Perilaku | | Jumlah Mencit yang Mengalami Perubahan | | | | |
|----------------------|---------------------------|--|-----------|------------|------------|-------------|
| | | Kontrol | CM 300 | CM 2000 | CM 7500 | CM 15000 |
| Aktivitas Mencit | Aktivitas Lokomotor turun | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Aktivitas Lokomotor naik | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Reaksi Aneh | Melompat-lompat | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Berkeliling tanpa arah | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Menyeruduk | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ekor Abnormal | Gerakan berputar-putar | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Ekor Kaku | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Ekor lemas | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sianosis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Hasil pengamatan uji kuantitatif selama 24 jam berupa angka kematian mencit yang ditunjukkan dalam Tabel 7.

Tabel 7. Jumlah kematian mencit uji toksisitas akut

| Keterangan | Perlakuan | | | | |
|----------------------------|-----------|-----------|------------|------------|-------------|
| | Kontrol | CM 300 | CM 2000 | CM 7500 | CM 15000 |
| Jumlah Sampel | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Jumlah Mencit yang Mati | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Persentase Mencit Mati (%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

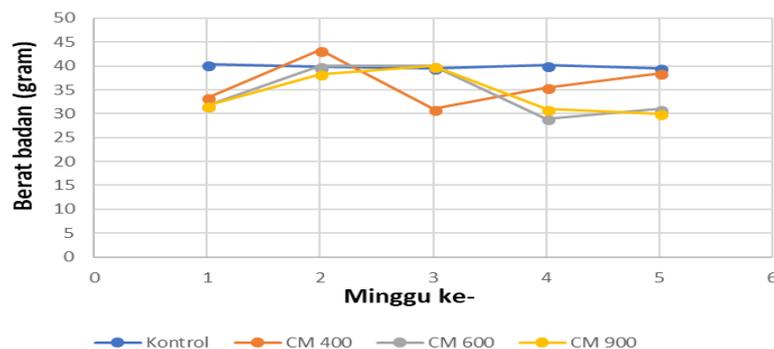
Hasil yang didapat menunjukkan tidak ada satu ekor mencitpun yang mati dari seluruh kelompok. Hal ini menunjukkan bahwa seluruh sampel yang diberi perlakuan tidak ada yang menunjukkan gejala toksik baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Untuk pengamatan LD50 belum diketahui secara pasti dikarenakan pemberian ekstrak biji *C. moschata* sampai dengan dosis 15000 mg/kgBB belum menunjukkan adanya gejala toksik yang berarti. Sehingga sesuai dengan kriteria Loomis (Tabel 1) untuk uji toksisitas akut ekstrak biji *C. moschata* dengan dosis paling tinggi sebesar 15000 mg/kgBB tetap tidak menunjukkan gejala kematian maka dapat dimasukkan dalam klasifikasi “Praktis Tidak Toksik” (Loomis, 1978). Konversi jumlah biji *C. moschata* yang dapat dikonsumsi manusia dari dosis maksimal tidak toksik adalah sebanyak 27,34 gram/kgBB.

b. Uji Toksisitas Subkronis

Uji toksisitas subkronis dirancang untuk melakukan evaluasi terhadap efek toksik suatu zat yang diberikan kepada hewan uji secara berulang-ulang dengan dosis tunggal perharinya dalam waktu 1 bulan (30 hari). Pemberian ekstrak dalam rentang waktu 30 hari pada hewan uji setara dengan 34 bulan pada manusia (Benitz, 1970). Jumlah hewan uji yang digunakan adalah 24 ekor mencit yang terbagi menjadi 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol. Kelompok perlakuan terbagi menjadi tiga yaitu dengan dosis 400 mg/kgBB, 600 mg/kgBB, dan 900 mg/kgBB. Peraturan BPOM tahun 2014 tentang Pedoman Uji Toksisitas Non Klinik secara In Vivo menyebutkan bahwa batas dosis maksimal yang diberikan untuk uji subkronis adalah 1000 mg/kgBB.

Perhitungan pemberian ekstrak biji *C. moschata* pada setiap mencit terdapat dalam Lampiran 2 dengan volume maksimal setiap mencit adalah 1 ml untuk sekali pemberian secara peroral. Dosis yang diberikan untuk mencit dikonversikan kepada manusia dengan perhitungan pada Lampiran 4, yaitu untuk ECM 400 mg/kgBB setara dengan 44,33 mg/kgBB, ECM 600 mg/kgBB setara dengan 66,49 mg/kgBB dan ECM 900 mg/kgBB setara dengan 99,74 mg/kgBB.

Pengamatan yang dilakukan untuk uji toksisitas subkronik berupa data berat badan yang dilakukan seminggu sekali, pengamatan histologi lambung yang meliputi skoring perdarahan dan jumlah PMN serta kematian mencit.. Hasil pengamatan berat badan mencit ditunjukkan pada Gambar 7 perkembangan berat badan mencit seetiap minggunya.



Gambar 7. Gambar perkembangan berat badan mencit

Grafik tersebut menunjukkan adanya penurunan rata-rata berat badan mencit dari minggu ke tiga menuju minggu ke empat pada ECM 600 mg/kgBB dan 900 mg/kgBB. Sedangkan untuk ECM 400 mg/kgBB mengalami kenaikan. Data statistik menggunakan uji *Paired Sample T-test* menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok dengan adanya nilai $p > 0,05$, meskipun

dalam grafik menunjukkan adanya penurunan berat badan. Hasil uji tersebut ditunjukkan pada Lampiran 14. Jumlah kematian mencit dalam 30 hari pemberian ekstrak biji *C. moschata* ditunjukkan pada Tabel 8.

Tabel 8. Jumlah kematian mencit uji toksisitas subkronis

| Hari Ke - | Jumlah Mencit Mati | | | |
|--------------------------------|--------------------|--------|--------|--------|
| | Kontrol | CM 400 | CM 600 | CM 900 |
| 1 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 6 | 0 | 1 | 0 |
| 11 | 6 | 1 | 1 | 1 |
| 12 | 6 | 1 | 3 | 3 |
| 13 | 6 | 1 | 4 | 4 |
| 14 | 6 | 1 | 5 | 4 |
| 15 | 6 | 1 | 5 | 4 |
| 16 | 6 | 1 | 5 | 4 |
| 17 | 6 | 1 | 5 | 4 |
| 18 | 6 | 1 | 5 | 4 |
| 19 | 6 | 1 | 5 | 4 |
| 20 | 6 | 1 | 5 | 5 |
| 21 | 6 | 1 | 5 | 5 |
| 22 | 6 | 2 | 5 | 5 |
| 23 | 6 | 2 | 5 | 5 |
| 24 | 6 | 2 | 5 | 5 |
| 25 | 6 | 2 | 5 | 5 |
| 26 | 6 | 2 | 5 | 5 |
| 27 | 6 | 2 | 5 | 5 |
| 28 | 6 | 2 | 5 | 5 |
| 29 | 6 | 2 | 5 | 5 |
| 30 | 6 | 2 | 5 | 5 |
| Presentase Kematian (%) | | 33.33 | 83.33 | 83.33 |

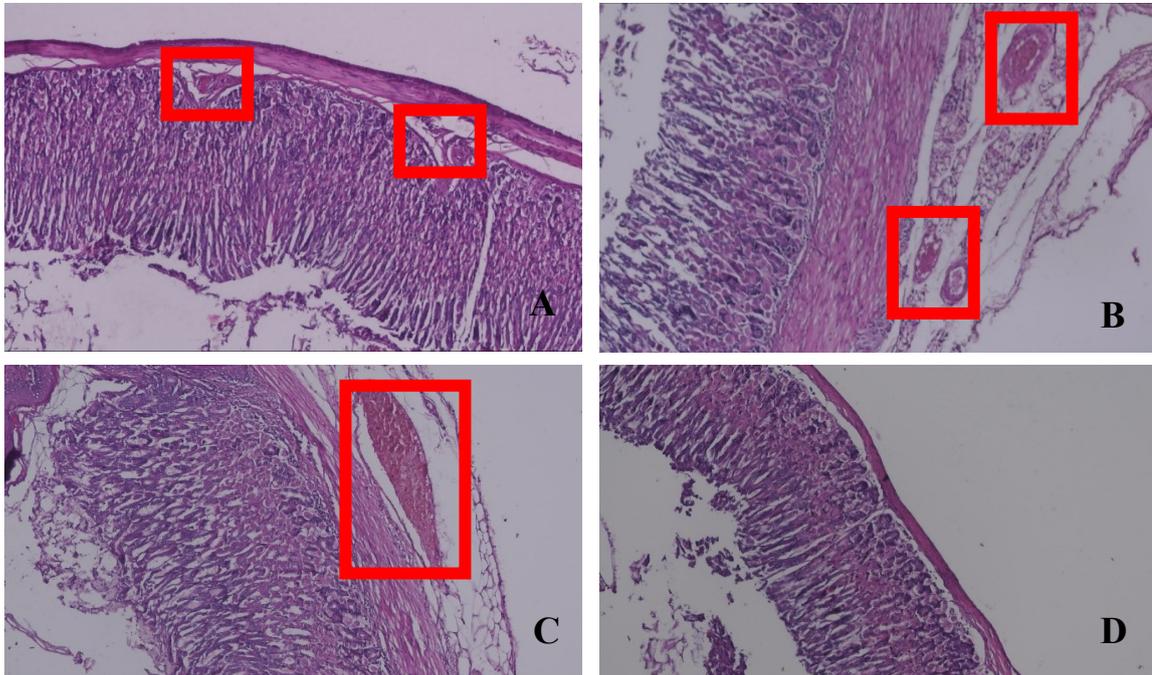
Dari Tabel 8 menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis yang diberikan menyebabkan kematian mencit dengan jumlah meningkat. Kematian mencit diawali pada hari kesepuluh pada dosis 600 mg/kgBB. Rata-rata kematian mencit ditandai dengan rendahnya suhu tubuh, lemas dan bulu rontok. Beberapa mencit juga mengalami gangguan pada penglihatannya bahkan sampai tidak bisa membuka mata diantaranya adalah salah satu mencit dengan pemberian dosis 400 mg/kgBB dan 600 mg/kgBB.

Pembedahan mencit dilakukan setiap mencit yang mengalami kematian dalam rentang waktu 30 hari. Mencit dibedah menggunakan seperangkat alat bedah dan diambil organ lambung. Selanjutnya lambung dicuci dan disimpan didalam pot organ menggunakan larutan formalin 10%. Larutan formalin 10% merupakan larutan standard yang sering digunakan untuk fiksasi jaringan pada kajian histologi ataupun histopatologi (Koncorojakti, 2014). Tujuan dari fiksasi adalah untuk mengawetkan jaringan sehingga jaringan secara permanen mirip sedekat mungkin dengan keadaan saat hidup serta untuk mengeraskan sehingga memudahkan pembuatan jaringan irisan yang tipis. Formalin dipilih karena memiliki beberapa kelebihan seperti pH mendekati normal, tidak terbentuknya pigmen formalin pada sediaan serta dapat disimpan dalam waktu yang lama. Preparat organ lambung dibuat menggunakan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE). Hematoksilin bekerja sebagai pewarna basa yang mewarnai unsur basofilik jaringan yaitu inti sel dan struktur asam lainnya dari sel seperti bagian sitoplasma menjadi warna biru. Sedangkan eosin bersifat asam yang akan memberikan warna

pada komponen yang bersifat basa pada jaringan seperti mitokondria, granula sekretori dan kolagen. Eosin memberikan warna merah pada komponen jaringan tersebut (Junquera, 2007). Tujuan dari pewarnaan ini adalah untuk mengetahui struktur umum sel maupun jaringan suatu organ.

Pengamatan perdarahan lambung mencit menggunakan mikroskop dengan perbesaran lemah yaitu 10x. Skoring perdarahan dinilai secara presentatif menggunakan perbandingan bagian preparat organ lambung yang normal pada setiap lapang pandang. Perdarahan merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk melihat perubahan struktur pada organ akibat adanya efek toksik yang ditimbulkan oleh ekstrak biji *C. moschata*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hampir dari semua mencit mengalami perdarahan pada bagian lambungnya. Akan tetapi termasuk dalam klasifikasi skoring 1 yang menunjukkan adanya perdarahan kurang dari 25% setiap lapang pandang pengamatan. Perdarahan yang teramati dalam preparat histologi mencit akibat pemberian ekstrak biji *C. moschata* ditunjukkan pada Gambar 8. Rata-rata perdarahan yang dialami mencit terjadi pada bagian submukosa dan tunika muscularis dari lambung. Pada gambaran histopatologi menggambarkan adanya bendungan perdarahan pada kotak merah. Erosi epitel mukosa lambung sangat sedikit terlihat, bahkan mendekati normal.



Gambar 8. Gambaran histologi lambung mencit pada perdarahan A. Kelompok perlakuan dosis 400 mg/kgBB, B. Kelompok perlakuan dosis 600 mg/kgBB, C. Kelompok perlakuan dosis 900 mg/kgBB, D. Kelompok perlakuan kontrol negatif

Dari hasil analisis statistik dengan uji *Kruskal Wallis* diperoleh nilai signifikansi untuk perdarahan adalah 0,065. Nilai ini $p > 0,05$ menunjukkan bahwa data tidak menunjukkan hasil yang berbeda signifikan. Sehingga meskipun pada hampir seluruh preparat organ lambung mencit yang diberikan ekstrak biji *C. moschata* menunjukkan hasil perdarahan. Akan tetapi, secara umum kondisi perdarahan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna (Tabel 9).

Tabel 9. Rerata dan Standart Deviasi Perdarahan Histologi Lambung

| Kelompok Perlakuan | Nilai Perdarahan |
|--------------------|---------------------|
| | Mean \pm SD |
| Kontrol | 0,3500 \pm 0,1048 |
| CM 400 | 0,6500 \pm 0,2167 |
| CM 600 | 0,4500 \pm 0,3016 |
| CM 900 | 0,3167 \pm 0,2639 |

Pengamatan histologi yang kedua adalah menskoring jumlah PMN yang ada dalam preparat histologi. Sel PMN dihitung secara manual dengan bantuan mikroskop pada perbesaran kuat yaitu 40x. PMN merupakan salah satu bentuk leukosit yang mempunyai inti yang bervariasi. Yang termasuk dalam PMN adalah neutrophil, eosinophil dan basofil (Guyton dan Hall, 1997). Sel PMN muncul dikarenakan terjadinya peradangan dalam suatu organ. Sel darah putih yang muncul pertama kali dalam jumlah besar pada awal peradangan adalah neutrofil.

Hasil skoring pengamatan PMN terhadap pemberian ekstrak *C. moschata* dosis tunggal berulang selama 30 hari pada preparat histologi lambung mencit ditunjukkan pada Lampiran 9. Interpretasi data skoring PMN dilakukan dengan menggunakan perhitungan statistik SPSS. Data yang diperoleh dinyatakan tidak terdistribusi normal dengan terdapatnya nilai signifikansi $p < 0,05$ yang ditunjukkan pada Lampiran 10. Metode uji yang digunakan untuk data nonparametrik adalah uji *Kruskall Wallis*. Hasil uji menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok dengan nilai signifikansi 0,045 ($p < 0,05$). Perbedaan antar kelompok ditunjukkan dalam Tabel 10.

Tabel 10. Rerata dan Standart Deviasi Jumlah PMN pada Histologi Lambung

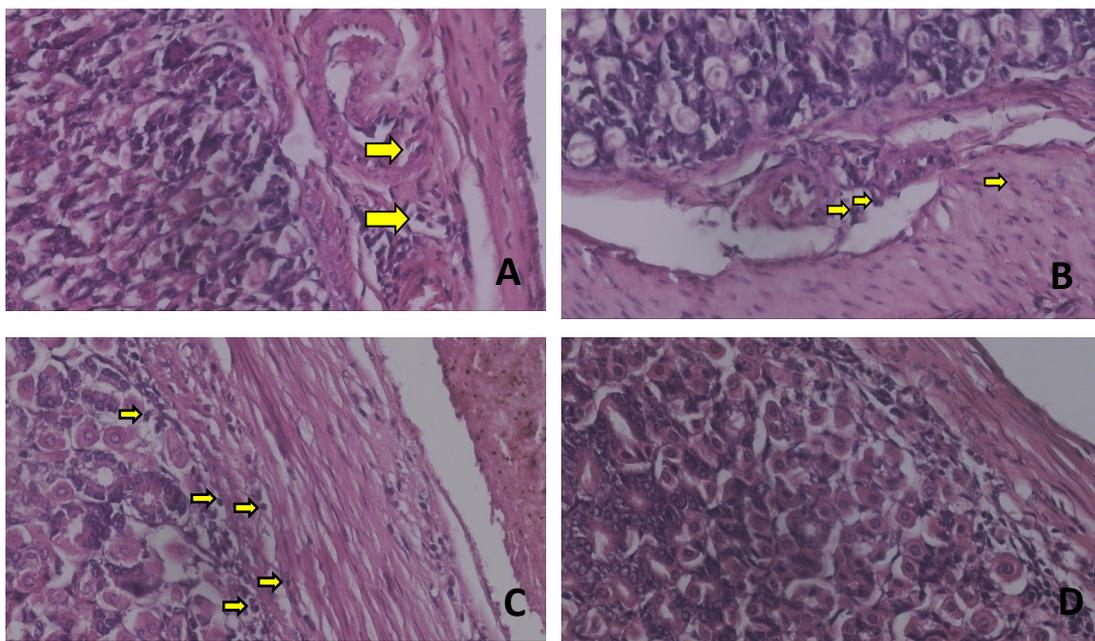
| No | Kelompok | Rerata ± SD |
|----|----------|--------------------------------|
| 1 | Kontrol | 0,3667 ± 0,2065 ^a , |
| 2 | CM 200 | 0,8000 ± 0,1788 ^{,b} |
| 3 | CM 400 | 0,7333 ± 0,3777 ^b |
| 4 | CM 900 | 0,8833 ± 0,4578 ^b |

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan

Berdasarkan uji *Man Withney* terdapat peningkatan jumlah PMN yang berarti antar kelompok yang ditandai dengan keterangan huruf a pada tabel 10. Kelompok kontrol mempunyai perbedaan yang signifikan dengan kelompok pemberian ekstrak biji *C. moschata* dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 600 mg/kgBB. Pada kelompok dosis 600 mg/kgBB dan kelompok dosis 900 mg/kgBB tidak menunjukkan perbedaan jumlah PMN yang signifikan. Peningkatan jumlah PMN terlihat secara jelas pada Gambar 9. Sel PMN ditunjukkan oleh panah berwarna kuning yang menggambarkan sel berwarna ungu dengan bentuk inti yang bervariasi.

Peningkatan jumlah PMN pada lambung setelah pemberian ekstrak biji *C. moschata* disebabkan oleh kandungan senyawa kimia tannin dalam biji labu kuning. Tannin merupakan salah satu senyawa golongan polivenol larut dalam alkohol yang dapat menjadi faktor agresif sehingga menimbulkan efek samping yang dapat merusak jaringan. Tannin akan bereaksi dan berikatan dengan protein pada mukus dan sel epitel mukosa ketika melewati membran mukosa traktus gastrointestinal. Proses ini disebut dengan astringensi. Dosis tinggi tannin dapat menyebabkan astringensi berlebihan sehingga berpotensi menyebabkan iritasi

mukosa lambung (Cannas, 2008). Tannin juga dapat mengurangi sekresi mukus yang merupakan barrier protektif dalam lambung. Komponen dari kondensasi tannin dapat merusak mukosa tractus gastrointestinal sehingga mudah teriritasi (Lestari, 2009). Penggunaan bahan yang mengandung bahan tannin tidak dianjurkan untuk digunakan dalam jangka panjang (Ismarani, 2012).



Gambar 9 . Gambaran histologi lambung pengamatn PMN preparat histologi : A. Kelompok dosis ekstrak biji *C.moschata* 400 mg/kgBB, B. Kelompok dosis ekstrak biji *C.moschata* 400 mg/kgBB, C. Kelompok dosis ekstrak biji *C.moschata* 400 mg/kgBB, D. Kontrol

Kerusakan mukosa lambung dapat terjadi disebabkan oleh faktor endongen maupun eksogen. Salah satu faktor eksogen yang menyebabkan kerusakan mukosa lambug disebabkan oleh senyawa kimia atau obat. Penelitian Amrulloh, 2016 tentang Hubungan konsumsi OAINS (Obat Antiinflamasi Non

Steroid) terhadap gastritis menyebutkan bahwa penggunaan OAINS sebagai penekan nyeri dapat mempengaruhi terjadinya gastritis. OAINS menurunkan produksi prostaglandin yang merupakan sitoproteksi dari mukosa lambung sehingga menyebabkan kerusakan mukosa lambung. Hal ini mejadi acuan bahwa kerusakan mukosa lambung dapat diakibatkan oleh senyawa kimia.