

LAPORAN KEMAJUAN PENELITIAN KEMITRAAN



UJI TOKSISITAS AKUT DAN SUB KRONIS EKSTRAK BIJI LABU KUNING (*Cucurbita moschata*) TERHADAP MENCIT

DISUSUN OLEH

Sri Tasminatun, S.Si., M.Si., Apt
Andy Eko Wibowo, M.Sc., Apt

NIDN : 0506117102
NIDN : 0502068801

**PRODI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA
2017**

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN KEMAJUAN PENELITIAN

1. Judul Penelitian : Uji Toksisitas akut dan sub kronis ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) pada mencit
2. Bidang Penelitian : Biomedis
3. Nama Rumpun ilmu : Farmakologi dan Farmasi Klinik
4. Ketua Tim Pengusul
 - a. Nama Lengkap : Sri Tasminatun, M.Si., Apt.
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. NIDN : 0506117102
 - d. Disiplin Ilmu : Farmakologi
 - e. Pangkat/Golongan : Asisten Ahli / IIIA
 - f. Jabatan Akademik : Penata Muda
 - g. Fakultas/Jurusan : FKIK / Farmasi
 - h. Alamat : Jalan Lingkar Selatan, Tamantirto, Kasihan, Bantul
 - i. Telp/Faks/E-mail : (0274) 387656 / (0274) 387658
 - j. Alamat Rumah : Kwarasan No.325 RT 14 RW 09 Nogotirto
 - k. Telp/Faks/E-mail : (0274) 545007, HP: 08997771645 / email : tasmi_a@yahoo.co.id
5. Anggota Tim Pengusul : Andy Eko Wibowo, M.Sc., Apt NIDN : 0502068801
6. Lokasi Penelitian : Laboratorium Biomedik FKIK UMY
7. Anggaran : Rp 7.500.000,00

Yogyakarta, 28 Agustus 2017

Ketua Peneliti,

Mengetahui,
Kaprodik Farmasi FKIK UMY



Sabtanti Harimurti, M.Sc, Ph.D., Apt
NIDN 0529026802

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke.

Sri Tasminatun, M.Si., Apt.
NIDN 0506117102

KATA PENGANTAR

Segala Puji bagi Allah SWT yang telah memberikan keselamatan, rahmat dan barokah sehingga laporan kemajuan penelitian dengan judul “Uji Toksisitas akut dan sub kronis ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) pada mencit” dapat disusun.

Akhir kata kami berharap semoga penelitian ini dapat dilanjutkan dan lancar seperti rencana

Yogyakarta, Agustus 2017
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Kata pengantar	iii
Daftar Isi.....	iv
Ringkasan	v
Bab I. Pendahuluan.....	1
Tujuan Penelitian.....	1
Manfaat Penelitian.....	2
Bab II. Tinjauan Pustaka.....	3
A. Labu kuning (<i>Cucurbita moschata</i>)	3
B. Uji toksisitas akut dan sub kronis	4
Bab III. Metode Penelitian.....	7
Bab IV. Hasil Penelitian	10
Daftar Pustaka.....	13

RINGKASAN

Biji Labu kuning (*Cucurbita moschata*) mengandung metabolit sekunder golongan isoflavon yang mempunyai struktur mirip dengan estrogen endogen. Ekstrak biji *C moschata* dapat meningkatkan kadar kalsium tulang tikus ovariektomi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas akut dan sub kronis ekstrak biji *C moschata* pada mencit.

Uji toksisitas akut akan dilakukan terhadap 30 ekor mencit jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan yaitu ekstrak biji *C moschata* dosis 5 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, 500 mg/kgBB dan 2000 mg/kgBB. Bahan uji diberikan secara oral *single dose*. Gejala toksik yang muncul diamati dan dihitung jumlah hewan uji yang mengalami kematian untuk menghitung LD50 nya. Uji toksisitas subkronis akan dilakukan terhadap 30 ekor mencit jantan, dibagi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol dan 4 kelompok ekstrak biji *C moschata* dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB. Bahan uji diberikan secara oral selama 90 hari. Gejala toksik yang muncul diamati dan dihitung jumlah hewan uji yang mengalami kematian. Pada hari ke 91 hewan uji dikorbankan. Hati, ginjal dan usus diambil dan dimasukkan dalam formalin 10 % untuk dibuat preparat histologi dengan pengecatan HE.

Saat ini penelitian pada tahap pembuatan ekstrak etanol Biji Labu kuning (*Cucurbita moschata*), proses penguapan etanol.

Kata kunci : *Cucurbita moschata*, toksisitas akut, toksisitas sub kronik

BAB I. PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Indonesia merupakan mega senter keanekaragaman hayati terbesar di dunia. Salah satu tanaman yang banyak tumbuh di Indonesia dan telah digunakan dalam pengobatan tradisional adalah Labu Kuning (*Cucurbita moschata*) yang termasuk familia Cucurbitaceae. Labu kuning (*Cucurbita moschata*) dibudidayakan di seluruh dunia. Tanaman ini menghasilkan buah yang dimanfaatkan untuk berbagai keperluan seperti dibuat menjadi manisan, atau dikonsumsi segar dalam salad atau makanan penutup.

Biji buah Cucurbitacea dilaporkan memiliki efek pencahar, antimuntah dan antihelmintics karena mengandung metabolit sekunder cucurbitacin (Bisognin, 2002;. Rahman *et al*, 2008 cit Dhiman *et al.*, 2012). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa cucurbitacin mempunyai efek anti-inflamasi melalui penghambatan enzim siklooksigenase (COX) (Peters *et al*, 1997; Yesilada *et al*, 1998 cit Dhiman *et al.*, 2012). Hasil penelitian Tasminatun & Wahyuni (2015) menunjukkan ekstrak biji *C moschata* dapat meningkatkan kadar calsium tulang tikus ovariektomi.

Pemanfaatan bahan alam tersebut harus mempertimbangkan banyak hal, beberapa di antaranya adalah: ketepatan dosis, ketepatan waktu dan cara penggunaan, dan yang tidak kalah penting adalah ketepatan telaah informasi. Meskipun bahan alam seperti jamu adalah relatif lebih aman, penggunaan dalam jangka waktu yang lama tetap mempunyai risiko untuk memberikan efek yang tidak diinginkan. Penggunaan bahan alam yang tidak tepat sangat berpotensi menyebabkan berbagai gejala yang tidak diinginkan. Tidak hanya obat, bahan alam juga mempunyai resiko yang cukup besar dalam menyebabkan kerusakan organ.

Suatu agen obat dapat dilanjutkan untuk uji klinik apabila sudah ada bukti ilmiah uji toksisitas, antara lain uji toksisitas akut dan sub kronis. Uji toksisitas akut adalah salah satu uji pra-klinik. Uji ini dirancang untuk mengukur derajat efek toksik suatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat, yaitu 24 jam setelah pemberiannya dalam dosis tunggal. Tolak ukur kuantitatif yang paling sering digunakan untuk menyatakan kisaran dosis letal atau toksik adalah dosis letal tengah (LD50) (Donatus, 2001).

B. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah

1. Berapakah LD50 ekstrak biji Labu kuning (*Cucurbita moschata*) ?

2. Apakah pemberian ekstrak biji Labu kuning (*Cucurbita moschata*) sub kronis memberikan efek toksis pada hewan uji ditinjau dari histologi organ ginjal, hepar, usus dan lambung?

C. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui LD50 dan uji toksisitas sub kronis ekstrak biji Labu kuning (*Cucurbita moschata*) pada hewan uji tikus.

D. Manfaat Penelitian

1. Apabila terbukti ekstrak biji Labu kuning (*Cucurbita moschata*) termasuk kategori relatif aman dan tidak menimbulkan toksisitas pada pemberian sub kronis maka dapat dikembangkan sebagai kandidat obat baru untuk berbagai terapi.
2. Memperkaya khasanah tanaman herbal di Indonesia

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

A. LABU KUNING (*Cucurbita moschata*)

Tanaman labu kuning berasal dari Ambon (Indonesia). Ada lima spesies labu yang umum dikenal, yaitu *Cucurbita maxima* Duchenes, *Cucurbita ficifolia* Bouche, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita moschata* Duchenes, dan *Cucurbita pipo* L. Kelima spesies cucurbita tersebut di Indonesia disebut labu kuning (waluh) karena mempunyai ciri-ciri yang hampir sama. Buah labu kuning berbentuk bulat pipih, lonjong, atau panjang dengan banyak alur (15-30 alur). Ukuran pertumbuhannya cepat sekali, mencapai 350 gram per hari. Tanaman *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret memiliki beberapa nama daerah yaitu Labu parang (Melayu), Waluh (Sunda), Waluh (Jawa Tengah). Buah dan biji labu kuning dapat dilihat pada Gambar 1.

Klasifikasi Tanaman labu kuning sebagai berikut :

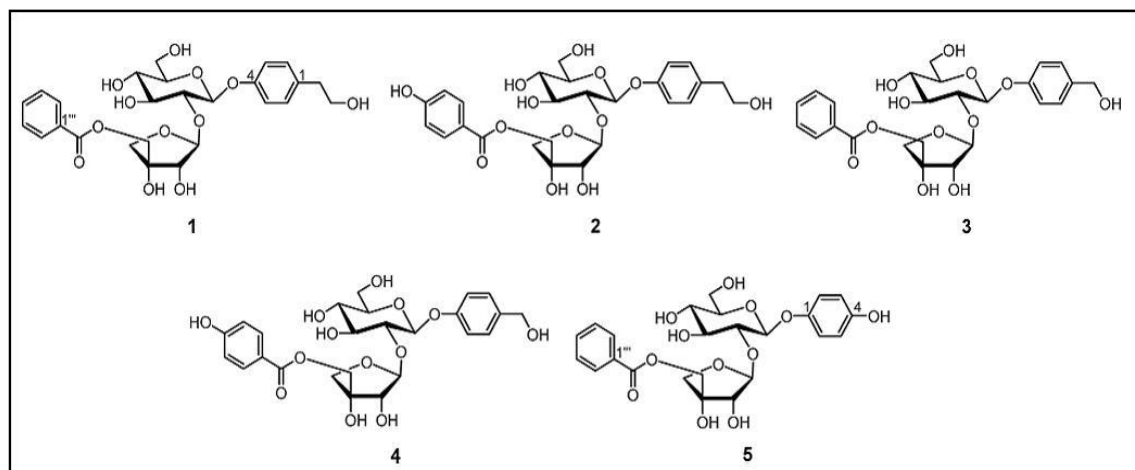
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Cucurbitales
Familia	: Cucurbitaceae
Genus	: Cucurbita
Spesies	: <i>Cucurbita moschata</i> Duch (Hutapea,1994)



Gambar 1. Biji labu kuning (*Cucurbita moschata*)

Labu kuning mengandung karotenoid (betakaroten), Vitamin A dan C, mineral, lemak serta karbohidrat. Dua senyawa glikosida fenolik yang termasuk golongan isoflavin telah diisolasi dari biji *Cucurbita moschata* yaitu (2-hydroxy) phenylcarbonyl 5-O-benzoyl-beta-D-apiofuranosyl(1→2)-beta-D-glucopyranoside (1) dan 4-beta-D-(glucopyranosyl hydroxymethyl) phenyl 5-O-benzoyl-beta-D-apiofuranosyl (1→2)- beta- D-glucopyranoside (2) (Li *et al.*,2009). Lima senyawa glikosida fenolik baru cucurbitosides A—E (1—5), diisolasi dari biji *Cucurbita*

moschata yaitu 2-(4-hydroxy) phenylethanol 4-O-(5-O-benzoyl)- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (1), 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol 4-O-[5-O-(4-hydroxy)benzoyl]- β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (2), 4-hydroxybenzyl alcohol 4-O-(5-O-benzoyl)- β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (3), 4-hydroxybenzyl alcohol 4-O-[5-O-(4-hydroxy)benzoyl]- β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (4) dan 4-hydroxyphenyl 5-O-benzoyl- β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (5) (Koike, *et al.*, 2005)



Gambar 2. Struktur glikosida fenolik cucurbitosides yang diisolasi dari biji *Cucurbita moschata*

Li FS *et al* (2009) juga menemukan senyawa glikosida fenolik dalam biji *C moschata* yaitu phenylcarbinyll 5-O-(4-hydroxy) benzoyl-beta-D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 2)-beta-D-glucopyranoside selain 1-O-benzyl [5-O-benzoyl-beta-D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]-beta-D-glucopyranoside 2, cucurbitosides C 3 and A 4. Senyawa glikosida fenolik dalam biji *C moschata* termasuk dalam golongan isoflavan.

Struktur kimia isoflavan sangat mirip dengan estrogen endogen. Karena kesamaan dalam struktur inilah, isoflavan dapat mengganggu aksi estrogen endogen tersebut. Isoflavon dapat menduduki receptor estrogen sehingga bisa mengurangi resiko kesehatan akibat defisiensi estrogen seperti yang terjadi pada menopause. Isoflavan dapat mengikat dan mengaktifkan reseptor estrogen (ER) pada sel. Sel manusia memiliki dua jenis reseptor-ER-alpha dan ER-beta yang memiliki distribusi dan efek biologis yang berbeda dalam jaringan yang berbeda. Berbeda dengan estrogen, yang bisa berikatan dengan media receptor, isoflavan lebih memilih ER-beta sehingga bisa disebut sebagai SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulator*) (Speroff, 2005)

Protein yang diisolasi dari Biji *Cucurbita pepo* dapat menurunkan kadar enzim lactate dehydrogenase (LD), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) pada tikus yang diinduksi dengan carbon tetrachloride (CCl₄) (Nkosi, 2005)

B. UJI TOKSISITAS AKUT DAN SUB KRONIS

Ketoksikan akut adalah derajat efek toksik suatu senyawa yang terjadi secara singkat (24 jam) setelah pemberian dalam dosis tunggal. Uji toksisitas akut adalah uji yang dilakukan untuk mengukur derajat efek suatu senyawa yang diberikan pada hewan coba tertentu, dan pengamatannya dilakukan pada 24 jam pertama setelah perlakuan dan dilakukan dalam satu kesempatan saja. Data kuantitatif uji toksisitas akut dapat diperoleh melalui 2 cara, yaitu dosis letal tengah (LD50) dan dosis toksik tengah (TD50). Namun yang paling sering digunakan adalah dengan metode LD50.

Tujuan dilakukannya uji toksisitas akut adalah untuk menentukan potensi ketoksikan akut dari suatu senyawa dan untuk menentukan gejala yang timbul pada hewan coba. Data yang dikumpulkan pada uji toksisitas akut ini adalah data kuantitatif yang berupa kisaran dosis letal atau toksik, dan data kualitatif yang berupa gejala klinis.

Pengamatan dilakukan 24 jam pertama sejak diberikan perlakuan, dan 7 – 14 hari pada kasus tertentu. Sebaiknya mengamati hewan coba sebelum diberi perlakuan. Hal ini bertujuan untuk mengetahui perubahan gejala yang terjadi setelah diberi perlakuan dengan membandingkan gejala atau perilaku sebelum perlakuan. Kriteria pengamatan meliputi: pengamatan terhadap gejala – gejala klinis, perubahan berat badan, jumlah hewan yang mati pada masing – masing kelompok uji dan histopatologi organ.

Pada dasarnya senyawa toksikan tidak mempengaruhi semua organ secara merata, karena adanya perbedaan tingkat kepekaan dari masing-masing organ, kadar bahan kimia atau metabolitnya terhadap organ sasaran serta mekanisme pemulihan dari setiap organ (Lu, 1995).

Ginjal dan hati merupakan organ vital dalam tubuh. Organ ini oleh beberapa zat kimia dapat dirusak melalui susunan saraf pusat atau pembuluh darah. Ginjal mudah mengalami kelainan akibat zat kimia karena ginjal mempunyai volume aliran darah yang tinggi (Lu, 1995). Indikasi gangguan ginjal dapat diamati dari rendahnya nilai bersihan kreatinin, yang disebabkan kadar kreatinin serum jauh lebih tinggi dari pada kadar kreatinin yang diekskresikan melalui urin (Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2008).

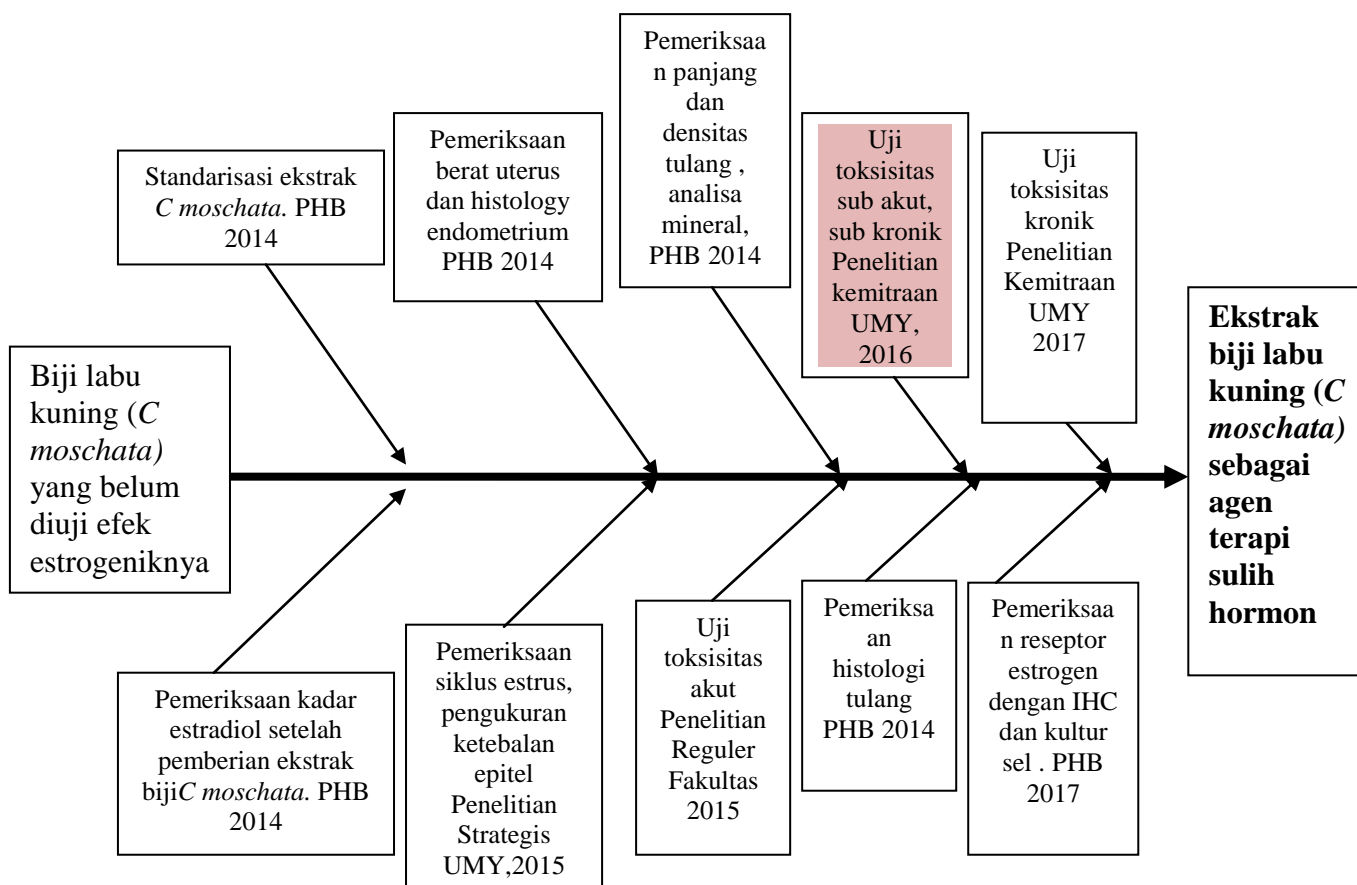
Hati merupakan organ utama sebagai pertahanan terhadap invasi bakteri dan agen toksik (Prince & Wilson, 1995). Hati juga merupakan organ yang berperan dalam fungsi metabolisme dan ekskresi di dalam tubuh. Hampir semua substansi yang masuk ke dalam tubuh dan mengikuti sirkulasi sistemik akan dimetabolisme di hati. Di hati terdapat hepatosit yang mengandung banyak enzim yang digunakan sebagai katalisator dalam metabolisme substansi, termasuk obat dan makanan (Guyton, 1996). Enzim yang spesifik diamati untuk monitoring fungsi hati adalah Serum

Glutamic Piruvic Transaminase (SGPT) atau Alanine Aminotransferase (ALT). Enzim ini secara normal berada di dalam sel hati. Namun jika terjadi kerusakan, sel hati akan melepaskan enzim ini ke dalam darah. Peningkatan kadar enzim ini di dalam darah menunjukkan kerusakan hati.

III. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian terdahulu.

Bagan alir penelitian (fish bone diagram) :



Keterangan : PHB = Penelitian Hibah Bersaing
 Penelitian kemitraan UMY, didanai oleh LP3M UMY

Tahapan penelitian

A. Pembuatan Ekstrak etanolik biji C moschata

Serbuk biji diekstraksi menggunakan etanol 96 % dengan metode maserasi sesuai Farmakope Indonesia edisi III. Ekstrak diuapkan diatas penangas air untuk menghilangkan cairan penyari (etanolik) hingga diperoleh ekstrak kental.

B. Subyek Uji

Subyek uji berupa 50 ekor mencit , umur 8 minggu, berat badan 230-280g diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pakan tikus berupa pakan standar BR I.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : dosis ekstrak biji Labu kuning (*Cucurbita moschata*) dan lama pemberian
2. Variabel tergantung : jumlah hewan uji yang mati, gejala – gejala klinis, perubahan berat badan, jumlah hewan yang mati pada masing – masing kelompok uji dan histopatologi organ : hepar, ginjal, usus
3. Variabel terkendali :
 - a. Subyek penelitian : mencit galur swiss, umur 8 minggu, berat badan 230-280g
 - b. Cara pemeliharaan hewan uji : dilakukan aklimatisasi, dipelihara dalam kondisi kandang, pakan minum dan pencahayaan yang sama.

D. Prosedur Penelitian

1. Persiapan dan Aklimatisasi

Subyek penelitian diaklimatisasi selama 1 minggu kemudian ditimbang

2. Pengelompokkan Subyek Penelitian

Hewan uji mencit dibagi menjadi 10 kelompok yaitu:

- a) Kelompok 1 tanpa diberi perlakuan apapun sebagai kontrol negatif
- b) Kelompok 2 : ekstrak etanol biji *C moschata* dosis 5 mgram/Kg BB
- c) Kelompok 3 : ekstrak etanol biji *C moschata* dosis 50 mgram/Kg BB
- d) Kelompok 4 : ekstrak etanol biji *C moschata* dosis 500 mgram/Kg BB
- e) Kelompok 5 : ekstrak etanol biji *C moschata* dosis 2000 mgram/Kg BB
Kelompok 1-5 untuk uji toksisitas akut
- f) Kelompok 6 tanpa diberi perlakuan apapun sebagai kontrol negatif
- g) Kelompok 7 : ekstrak etanol biji *C moschata* dosis 0,20 gram/Kg BB
- h) Kelompok 8 : ekstrak etanol biji *C moschata* dosis 0,40 gram/Kg BB

- i) Kelompok 9 : ekstrak etanol biji *C moschata* dosis 0,60 gram/Kg BB
 - j) Kelompok 10 : ekstrak etanol biji *C moschata* dosis 0,80 gram/Kg BB
- Kelompok 6-10 untuk uji toksisitas sub kronis

3. Perlakuan pada hewan uji

Hewan uji kelompok 2-5 diberikan bahan uji sesuai dosis, *single dose* dan dilakukan pengamatan selama 24 jam, meliputi gejala klinis yang muncul dan jumlah hewan uji yang mengalami kematian.

Hewan uji kelompok 7-10 diberikan bahan uji sesuai dosis 1 kali sehari selama 30 hari dan dilakukan pengamatan meliputi gejala klinis yang muncul dan jumlah hewan uji yang mengalami kematian. Pada hari ke 31 hewan uji dikorbankan. Organ hati, ginjal dan usus diambil, difiksasi dalam formalin 10 %. Organ tersebut dibuat preparat histologi dengan pengecatan HE dan diamati dengan mikroskop pada perbesaran 100x.

E. Analisis Data

Pada uji toksisitas akut data jumlah hewan uji yang mengalami kematian dianalisis untuk menghitung LD50. Gejala klinis yang muncul dianalisis secara deskriptif. Pada uji toksisitas akut, data jumlah hewan uji yang mengalami kematian dianalisis, dibandingkan antar kelompok. Hasil pengamatan histologi organ dianalisis secara deskriptif dibandingkan antar kelompok.

BAB IV. HASIL PENELITIAN

Saat ini penelitian pada tahap identifikasi bahan uji dan pembuatan ekstrak etanol Biji Labu kuning (*Cucurbita moschata*) , proses penguapan etanol. Hewan uji sedang dipesan.

DAFTAR PUSTAKA

- Donatus IA. Toksikologi Dasar. Yogyakarta: Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada; 2001
- Hutapea, J.R. (1994). Inventaris Tanaman Obat Indonesia III. Jakarta: Departemen Kesehatan RI
- Koike K, Li W, Liu L, Hata E, Nikaido T. 2005. New phenolic glycosides from the seeds of *Cucurbita moschata*. *Chem Pharm Bull.* Feb;53(2):225-8.
- Li FS, Xu J, Dou DQ, Chi XF, Kang TG, Kuang HX, 2009. Structures of new phenolic glycosides from the seeds of *Cucurbita moschata*. *Nat prod Commun.* Apr;4(4):511-2
- Nkosi, Opoku, Terblance, 2005. Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate on the activity levels of certain plasma enzymes in CCl₄-induced liver injury in low-protein fed rats. *Phytother Res*, Apr; 19(4) : 341-5.