

Uji Ekstrak n-Hexana Rumput Kebar (*Biophytum petersianum* Klotzsch) pada Tikus Wistar Hiperkolesterolemia

Test of the n-Hexane Extract of Rumput Kebar (Biophytum petersianum Klotzsch) on High Cholesterol Wistar Rats

Priyo Sambodo¹, Purwaningsih¹, Alnita Baaka¹, Trini Susmiati², Claude Mona Airin^{3*}

¹Program Studi Diploma 3 Kesehatan Hewan, Fakultas Peternakan, Universitas Papua
Jl. Gunung Salju, Amban, Manokwari, Papua Barat, 98314, Indonesia

²Departemen Biokimia, ³Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Gadjah Mada

Jl. Fauna No. 2, Karangmalang, Yogyakarta, 55281, Indonesia

*Email: monairin@ugm.ac.id

Naskah diterima : 23 Agustus 2017, direvisi : 9 Desember 2018, disetujui : 9 Desember 2018

Abstract

This study was aimed to determine the secure level of the n-hexane extract of kebar grass on hypercholesterolemia rats based the acute oral toxicity test. Based the literature, no report on the toxic dosage before, initial dose was started at 300 mg/kg body weight (BW) and to be increased 2000 to 5000 mg/kg BW. Toxicity data were set for 24 hours and continued until 14 days after treatment for several parameters, i.e : toxicity symptoms, death of animals, changes in body weight and the manifestation of toxicity effects. At the end of the test, the rats were sacrificed and organs were taken for abnormalities (macroscopy). The results of this study showed that the administration of the n-hexane extract of grass kebar at all doses did not show the toxicity symptoms, mortality and body weight change. The absolute and relative weights and gross pathology observation of the internal organ were normal. Conclusions: the n-hexane extract of grass kebar is safe and the LD₅₀ was determined on category 5, unclassified or minimum practically non toxic

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat keamanan ekstrak n-hexana rumput kebar pada tikus hiperkolesterolemia menggunakan metode uji toksisitas akut oral. Berdasarkan literatur, tidak ada laporan mengenai dosis toksisitas sehingga *starting* dosis dimulai pada *limit test* 300 mg/kg BB dan jika perlu ditingkatkan ke dosis 2000-5000 mg/kg BB. Data gejala toksik dan kematian hewan ditetapkan selama 24 jam setelah perlakuan dan pengamatan uji tetap dilanjutkan sampai 14 hari setelah perlakuan sediaan uji. Selama 14 hari dilakukan pengamatan gejala-gejala toksik, kematian hewan uji, perubahan kenaikan berat badan dan manifestasi efek toksik. Pada akhir uji, tikus dikorbankan dan diambil organ vitalnya dan dievaluasi terhadap kelainan gross patologi (makroskopi). Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak n-hexana rumput kebar pada dosis *limit test* 300 mg/kg BB dan 5000 mg/kg BB tidak menimbulkan gejala toksik maupun kematian hewan uji. Pada organ vital tidak ditemukan adanya perubahan. Analisis statistik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada berat badan, berat absolut organ dan berat relatif organ antara kelompok kontrol dan perlakuan. Kesimpulan: pemberian ekstrak n-hexana rumput kebar aman diberikan pada dosis 300 mg/kg BB, 2000 mg/kg BB dan 5000 mg/kg BB secara peroral

Kata kunci: hiperkolesterolemia; rumput kebar; tikus

Pendahuluan

Rumput Kebar (*Biophytum petersianum* Klotzsch) merupakan salah satu spesies dari genus *Biophytum* dalam family *Oxalidaceae* yang

merupakan salah satu tumbuhan endemik Indonesia (Papua) yang telah dimanfaatkan sebagai tanaman obat, khususnya oleh penduduk lokal. *Biophytum* diyakini memiliki potensi sebagai antihiperlipidemia

(Kakade *et al.* 2015; Renuka *et al.* 2015). Penelitian terakhir menyebutkan bahwa ekstrak rumput kebar dapat menurunkan tingkat kolesterol total pada serum kelinci (Sambodo *et al.*, 2015). Berdasarkan parameter darah, uji toksisitas ekstrak *n*-hexana rumput kebar pada tikus normal tidak menyebabkan ketoksikan dan atau kematian pada hewan coba (Sambodo *et al.*, 2016). Akan tetapi, uji toksisitas ekstrak *n*-hexana rumput kebar pada tikus hiperkolesterolemia belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengetahui tingkat keamanan ekstrak *n*-hexana rumput kebar pada tikus hiperkolesterolemia melalui uji toksisitas akut oral berdasarkan gejala-gejala toksik, berat badan, berat organ relatif dan gross patologi.

Materi dan Metode

Pada penelitian ini menggunakan tikus yang berasal dari LPPT Unit IV. Tikus dipelihara dalam kandang komunal dengan ukuran p x l x t (42cm x 21cm x 20cm), suhu ruang pemeliharaan 22°C-15°C, kelembaban 60%-70% dengan siklus cahaya 12 gelap 12 terang. Semua perlakuan dalam penelitian ini sudah mendapat persetujuan tim kelayakan etik LPPT dengan nomor 00034/04/LPPT/IX/2016.

Ekstraksi Rumput Kebar

Sejumlah serbuk rumput kebar (diperoleh dari Distrik Kebar Tengah yang terletak pada 13303°25,8' Bujur Timur dan 0048°31,1' Lintang Selatan dengan ketinggian 590 m dpl, Kabupaten Tambrau Propinsi Papua Barat), diidentifikasi di Herbarium Manokwariense Pusat Penelitian Keanekaragaman Hayati Universitas Papua, direndam dalam larutan ethanol (Merck^R) 50% dan diaduk selama 30 menit dan didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring dengan ukuran pori 2,5 µm untuk memperoleh filtrat. Proses

diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh filtrat hasil dari 3 kali perendaman (filtrat I) dan ampas (Yunita *et al.*, 2009). Selanjutnya filtrat I diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* (Yamato) pemanas *water bath* pada suhu 70 °C, sehingga diperoleh filtrat pekat. Filtrat pekat ditambah *n*-hexana kemudian dicampur selama 5 menit dan didiamkan selama 1 jam lalu dipisahkan dengan corong pisah. Proses ini diulang sebanyak 5 kali sehingga diperoleh filtrat II dan residu. Selanjutnya filtrat II diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* pemanas *water bath* pada suhu 45 °C sehingga diperoleh ekstrak rumput kebar fraksi *n*-hexana (Chapagain dan Wiesman, 2005; Bogoriani, 2008).

Uji Toksisitas Akut secara Oral

Uji toksisitas akut oral dilakukan berdasarkan OECD 423 dan Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis Secara *In Vivo*. Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus jantan galur *wistar* (umur 6-8 minggu). Sebanyak 18 ekor tikus dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok yang terbagi atas 3 ekor (kelompok I), 6 eko2 (kelompok II), 6 ekor (kelompok III) dan 3 ekor (kelompok IV). Hewan uji dipelihara di dalam kandang individu. Pakan yang diberikan sebanyak 15 g per ekor per hari dan minum secara *ad libitum*.

Induksi dilakukan menurut Mamoat (2001) dengan modifikasi. Setiap kelompok hanya diberi pakan standar komersial selama 7 hari sebagai masa adaptasi. Setelah masa adaptasi seluruh kelompok diinduksi hiperlipidemia dengan pemberian kolesterol murni 0,03 gram dan minyak babi 1 gram per ekor selama 28 hari. Pada kelompok II, III dan IV diberi perlakuan fraksi *n*-hexana ekstrak rumput kebar dan kelompok I (kontrol) tidak diberikan perlakuan. Ekstrak rumput kebar dilarutkan dalam aquadest

sampai volume 3 ml. Perincian perlakuan pada masing-masing kelompok adalah sebagai berikut:

- A. Kelompok I : aquades
- B. Kelompok II : fraksi n-hexana 300 mg/kg
- C. Kelompok III : fraksi n-hexana 2000 mg/kg
- D. Kelompok IV : fraksi n-hexana 5000 mg/kg

Metode uji mengacu pada metode uji toksisitas oral 423. Dosis yang diberikan mulai dari 300 mg/kg BB, jika hewan coba tidak menunjukkan gejala klinis yang berarti dan tidak menimbulkan kematian maka dosis diberikan 2000 mg/kg BB. Dosis akan ditingkatkan menjadi 5000 mg/kg BB jika tidak muncul gejala klinis ataupun kematian. Pemeriksaan hematologi meliputi pemeriksaan kolesterol total dan trigliserida dari serum yang diambil melalui sinus orbitalis setelah hewan di anestesi dengan ketamine pada akhir masa induksi. Pemeriksaan dilakukan dengan metode *chod-pap* menggunakan microlab 200 di LPPT UGM

Pengamatan potensi ketoksikan dilakukan dengan menghitung jumlah hewan coba yang mati dan pengamatan gejala klinis terdiri atas pengamatan sistem tubuh yang terdiri atas aktivitas motorik, sikap tubuh, defekasi, urinasi, pernafasan dan salivasi (Diantika dan Wiwiek, 2016). Pengamatan dilakukan selama 14 hari setelah pemberian dosis tunggal ekstrak n-hexana rumput kebar (Sambodo *et al.*, 2018) Penimbangan berat badan dilakukan untuk semua hewan coba pada hari pertama dan terakhir masa observasi.

Nekropsi hewan uji dilakukan dengan ketamine dosis lethal setelah masa observasi selesai. Pemeriksaan patologi meliputi pemeriksaan gross nekropsi (makroskopis) organ terhadap abnormalitas dan lesi. Organ internal (otak, jantung, paru, hepar, lambung, usus, ginjal, limpa) dikeluarkan dari rongga tubuh, dibersihkan dari lemak dan ditimbang (berat absolut). Berat relatif organ (BRO) diperoleh dengan

rumus menurut Halim *et al.* (2011):

$$\text{BRO} = (\text{berat organ (g)} / \text{berat badan tikus mati (g)} \times 100)$$

Analisis Data

Semua data kuantitatif dianalisis secara statistik menggunakan SPSS 23. Data dinyatakan dalam mean \pm standar deviasi. Perbedaan dari pengaruh perlakuan yang berbeda dianalisa dengan analisis sidik ragam dan beda nyata ($P < 0,05$) dilanjutkan dengan uji lanjut metode Duncan (*Duncan Multiple Range Test*).

Hasil dan Pembahasan

Induksi Hiperkolesterolemia

Rata-rata tingkat kolesterol total dan gliserida pada seluruh tikus setelah induksi hiperlokesterolemia masing-masing adalah $72,0 \pm 9,8$ dan $79,9 \pm 28,1$ mg/dl. Giknis dan Clifford (2008), menyatakan bahwa rata-rata kolesterol dan trigliserida pada tikus jantan Wistar umur 8-16 minggu masing-masing adalah 58 ± 13 dan 44 ± 21 sehingga dapat dikatakan bahwa hewan coba mengalami hiperlokolesterolemia.

Ketoksikan Akut dan Gejala Klinis

Pada seluruh kelompok perlakuan tidak ditemukan tikus yang mati dan tidak terlihat efek ketoksikan akut selama 14 hari waktu pengamatan. Pada pengamatan fisik tidak ditemukan adanya gejala-gejala keracunan seperti perubahan pada kulit dan rambut, mata dan membrana mukosa, pola tingkah laku, tremor, salivasi, diare, pingsan dan koma. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Oraon dan Sinha (2012), yang menyebutkan bahwa ekstrak alkohol *Biophytum reinwardtii* (dosis 50, 75 dan 100 mg/kg) mungkin aman untuk tikus, dimana dari hasil uji toksisitas akut ekstrak tersebut tidak ditemukan gejala-gejala keracunan maupun kematian pada hewan coba.

Tidak ditemukannya tikus yang mati pada seluruh kelompok dapat diartikan bahwa LD_{50} ekstrak

n-hexana rumput kebar lebih dari 5000 mg/kg BB. Hasil tersebut berbeda dengan hasil penelitian Banerjee *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa ekstrak ethanol *Biophytum sensitivum* DC ditemukan pada dosis 5000 mg/kg BB tikus yang diinduksi ulcer perut. Perbedaan ini diyakini disebabkan oleh perbedaan induksi yang dilakukan.

Berat Badan

Berat badan kelompok perlakuan dan kontrol ditunjukkan pada Tabel 1. Terjadi peningkatan secara bertahap pada berat badan perlakuan dan kontrol. Berat badan kelompok perlakuan tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol. Persentase peningkatan berat badan pada seluruh kelompok masing-masing adalah 15,3%, 15,6%, 12,7% dan 13,0%.

Tabel 1. Berat badan kelompok kontrol dan perlakuan yang diberikan ekstrak rumput kebar.

	Berat Badan (gr)	
	Hari ke-29	Hari ke-42
Kontrol	172,93±16,34	188,20±13,36
300 mg/kg BB	166,33±13,51	181,93±19,11
2000 mg/kg BB	175,87±13,57	188,60±14,64
5000 mg/kg BB	163,33±17,72	176,37±10,55

Nilai dinyatakan dalam mean±standar deviasi, n=3.

Perubahan berat badan merupakan indikasi efek samping dari obat-obatan dan bahan kimia dan akan signifikan apabila perubahan tersebut melebihi 10% dari berat badan awal (Vaghasiya *et al.*, 2010). Tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan sesuai dengan hasil penelitian Oraon dan Sinha (2012), yang menyebutkan bahwa ekstrak alkohol *Biophytum reinwardtii* (dosis 50, 75 dan 100 mg/kg) tidak mempengaruhi berat badan tikus.

Patologi

Pemeriksaan gross patologi (makroskopis) tidak ditemukan adanya perubahan apapun pada setiap organ yang diperiksa. Berat absolut organ dan berat relatif organ per 100 gram berat badan yang diperoleh pada akhir masa observasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol (Tabel 2 dan Tabel 3).

Tabel 2. Berat absolut organ kontrol dan perlakuan yang diberikan ekstrak rumput kebar

	Kontrol	300 mg/kg BB	2000 mg/kg BB	5000 mg/kg BB
Otak	1,73±0,06	1,77±0,15	1,77±0,06	1,83±0,06
Jantung	0,63±0,06	0,73±0,15	0,70±0,10	0,67±0,12
Paru	1,60±0,10	1,50±0,17	1,80±0,44	1,60±0,10
Hepar	6,90±0,40	6,83±1,19	6,80±1,13	5,83±1,40
Lambung	2,83±0,45	2,47±1,03	2,70±0,62	2,47±1,32
Usus	15,13±1,91	14,63±1,16	15,03±2,84	13,37±1,74
Ginjal	1,17±0,15	1,17±0,15	1,27±0,23	1,17±0,06
Limpa	0,43±0,06	0,50±0,00	0,50±0,10	0,43±0,06

Berat badan merupakan indikator penting keadaan fisiologi dan patologi baik pada manusia maupun hewan. Berat organ relatif merupakan

diagnosa dasar apakah suatu organ terpapar mengalami kerusakan atau tidak (Rajeh *et al.*, 2012). Organ jantung, hepar, ginjal, limpha dan paru

merupakan organ utama yang dipengaruhi oleh reaksi metabolik yang disebabkan oleh toksikan (Vaghasiya *et al.*, 2010). Pengukuran terhadap berat absolut organ ditujukan untuk mengetahui ketoksikan nefrotik yang disebabkan oleh nefrotoksik (Dybing *et al.*, 2002). Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Oraon dan

Sinha (2012), yang menyebutkan bahwa ekstrak alkohol *Biophytum reinwardtii* (dosis 50, 75 dan 100 mg/kg) tidak menunjukkan perbedaan signifikan secara statistik, baik pada berat organ relatif maupun absolut antara kelompok perlakuan dengan kontrol.

Tabel 3. Berat relatif organ kontrol dan perlakuan yang diberikan ekstrak rumput kebar

	Kontrol	300 mg/kg BB	2000 mg/kg BB	5000 mg/kg BB
Otak	0,92±0,07	0,97±0,03	0,94±0,04	1,04±0,03
Jantung	0,34±0,01	0,41±0,10	0,37±0,03	0,38±0,04
Paru	0,85±0,10	0,82±0,04	0,96±0,26	0,91±0,11
Hepar	3,67±0,06	3,74±0,35	3,59±0,34	3,31±0,11
Lambung	1,56±0,32	1,34±0,58	1,46±0,44	1,40±0,24
Usus	8,02±0,58	8,08±0,73	7,93±0,96	7,58±0,88
Ginjal	0,62±0,07	0,64±0,07	0,67±0,07	0,66±0,03
Limpa	0,23±0,04	0,28±0,03	0,26±0,04	0,25±0,02

Nilai dinyatakan dalam mean±standar deviasi, n=3,

Kesimpulan

Pemberian ekstrak n-hexana rumput kebar secara peroral tidak menimbulkan gejala toksisitas, kematian dan perubahan pada berat organ pada tikus dalam kondisi hiperkolesterol.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia melalui skema hibah Penelitian Kerja Sama Antar Perguruan Tinggi (PKPT) dengan nomor kontrak: 089/SP2H/LT/DRPM/IV/2017.

Daftar Pustaka

- Banerjee, A., Al Rashid, H., Rahman, A., Pal, T.K. (2014). *In-vivo* screening of ethanolic extract of *Biophytum sensitivum* DC leaves on peptic ulcer induced by aspirin in Wistar albino rats. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*. 3(6): 418-422.
- Bogoriani, N.W. (2008). Isolasi dan Identifikasi Glikosida Steroid dari Daun Andong (*Cordyline terminalis* Kunth). *Jurnal Kimia* 2 (1).40-44.
- BPOM. (2014). Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis secara *in vivo*. Badan Pengawas Obat dan Makanan RI.
- Chapagain, B.P., and Wiesman, Z. (2005). Larvicidal Activity of the Fruit Mesocarp Extract of *Balanites aegyptiaca* and its Saponin Fractions against *Aedes aegypti*. *B. Dengue*. 29.
- Diantika, L. N dan Wiwiek L., (2016). Uji toksisitas akut ekstrak etanol benalu mangga (*Dendrophthoe petandra*) terhadap mencit swiss webster. *IJPST*. 3 (2): 53-65
- Dybing, E., Doe, J., Groten, J., Kleiner, J., Brien, J.O., Renwick, A.G. (2002). Hazard characterization of chemicals in food and diet: dose response, mechanism and extrapolation issues. *Food Chem Toxicol*. 42:237–282.
- Giknis M.L.A dan Clifford, C.B. (2008). Clinical laboratory parameters for CrI: WI (Han). Charles River Laboratories. Montreal. 8.
- Halim, S.Z., Abdullah, N.R., Afzan, A., Abdul Rashid, B.A., Jantan, I. Dan Ismail, Z. (2011). Acute toxicity study of *Carica papaya* leaf extract in Sprague Dawley rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(20): 1867-1872.

- Kakade, R.T., Sandu, N and Senthilkumar, K.L. (2015). Evaluation of hypolipidemic and anti-obesity activities of *Biophytum sensitivum* Linn extracts on high fat diet induced hyperlipidemic rats. *IJPCBS*, 5(1): 357-360.
- Mamoat, L.I. (2001). Minyak sawit mempercepat regresi aterosklerosis aorta pada kelinci hiperkolesterolemia ringan tetapi tidak apada yang hiperkolesterolemia berat. Tesis. Program Pascasarjana IPB.
- OECD. (2008). OECD 407. Guidelines for the Testing of Chemicals. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents.
- Oraon A. and Sinha B.N. (2012). Sub chronic toxicity potential of the alcoholic extract of *Biophytum reinwardtii* whole plant. *Journal of Natural Sciences Research*. 2(6): 94-100.
- Rajeh, M.A.B., Kwan, Y.P, Zakaria, Z., Latha, L.Y., Jothy, S.L., Sasidharan, S. (2012). Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. *Pharmacognosy Res*. 4(3): 170–177.
- Renuka, C., Elavarasi, S., Saravanan, K and Revathi, G. (2015). Antihyperlipidemic activity of *Biophytum sensitivum* extracts in streptozotocin (STZ) induced diabetic albino rats, *Int J Pharm Bio Sci*. 6(4): 128-135.
- Sambodo, P., Tethool, A.N. dan Rumetor, S.D. (2015). Efek antikolesterol fraksi n-Heksana Rumput Kebar pada hewan model hiperlipidaemia. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 9(1): 59-60.
- Sambodo, P., Nurhayati D., Purwaningsih, Airin, C.M. dan Susmiati, T. (2016). Parameter eritrosit pada uji toksisitas subkronis ekstrak n-hexana rumput Kebar (*Biophytum petersianum* Klotzsch) endemik Papua. Proceedings: Peran Dokter Hewan dalam Peningkatan Kesehatan Hewan, Lingkungan dan Manusia. FKH UGM. 111-113.
- Sambodo, P., Nurhayati, D., Purwaningsih, Trini, S. dan Claude, M.A., (2018). Subchronic toxicity test of kebar grass extract of n-Hexane (*Biophytium Petersianum* Klotzcch) on weight, ADG, and vital organ of Rat (*Rattus norvegicus*). *J. Foof Pharm. Sci*. 6:14-16
- Vaghasiya, Y.K., Shukla, V.J., Chanda, S.V. (2010). Acute oral toxicity study of *Pluchea arguta* boiss extract in mice. *J Pharmacol Toxicol*. 6:113–123.
- Yunita, E.A., Suprapti N.H. dan Hidayat J.W. (2009). Pengaruh ekstrak daun Teklan (*Eupatorium riparium*) terhadap mortalitas dan perkembangan larva *Aedes aegypti*. *BIOMA*. 11. 1.