

**TOKSISITAS DEKOKTA
DAUN PULUTAN
(URENA LOBATA)
PADA IKAN ZEBRA
(DANIO RERIO)**

Yudi Purnomo

**TOKSISITAS DEKOKTA
DAUN PULUTAN
(URENA LOBATA)
PADA IKAN ZEBRA
(DANIO RERIO)**

Inara Publisher

2022

Perpustakaan Nasional: Katalog dalam Terbitan (KDT)

Penulis

Yudi Purnomo

TOKSISITAS DEKOKTA DAUN PULUTAN (URENA LOBATA) PADA IKAN ZEBRA (DANIO RERIO)

Ed. 1, -1- Malang: Inara Publisher, 2022

xii, 58 hlm., 15,5 X 23

ISBN: 978-623-5970-30-1

1. Toksikologi

I. Judul

615.9

Hak cipta 2022, pada penulis

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh isi buku dengan cara apapun, baik berupa fotokopi, scan, PDF, dan sejenisnya.

Anggota IKAPI No. 306/JTI/2021

Cetakan I, April 2022

Hak penerbitan pada Inara Publisher

Desain Sampul: Dana Ari

Layout Isi: Tim Layout Inara Publisher

Dicetak oleh **PT Cita Intrans Selaras** (Citila Grup)

Diterbitkan pertama kali oleh **Inara Publisher**

Jl. Joyosuko Agung RT.3/RW.12 No. 86 Malang

Telp. 0341-588010/CS. 081336120162

Email: inara.publisher@gmail.com

Web: www.inarapublisher.com

Pengantar Penulis

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah Swt yang telah memberikan kekuatan dan bimbingan-Nya kepada saya sehingga buku ini dapat diselesaikan dengan baik. Terima kasih juga saya sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian buku ini.

Seiring dengan berjalannya waktu, perkembangan keilmuan dan teknologi terus mengalami kemajuan pesat, termasuk hasil-hasil penelitian yang berkembang sangat dinamis. Kondisi ini menuntut kita semua untuk terus menerus melakukan peningkatan keilmuan sepanjang hayat. Sehingga terjadi pembaharuan dan peningkatan kapasitas individu.

Kehadiran buku ini dapat dijadikan salah satu bukti perkembangan keilmuan. Didasarkan pada penelitian untuk memahami bukti ilmiah keamanan penggunaan daun Pulutan melalui pengujian toksisitas baik umum dan khusus pada beberapa fase kehidupan. Mudah mudahan buku ini mampu menjadi rujukan dalam memahami tentang keamanan penggunaan bahan alam untuk keperluan pengobatan jangka pendek maupun panjang. Mudah mudahan buku ini mampu menjadi rujukan dalam memahami tentang keamanan penggunaan bahan alam untuk keperluan pengobatan jangka pendek maupun panjang.

Malang, Maret 2022

Penulis

Pengantar Penerbit

Indonesia dikenal sebagai negara yang memiliki keanekaragaman flora terbesar kedua setelah Brazil. Kekayaan flora Indonesia ini mencakup 30.000 jenis tumbuhan dari total 40.000 jenis tumbuhan di dunia dengan 9.600 jenis di antaranya merupakan tumbuhan berkhasiat obat. Dengan adanya kekayaan flora tersebut, membuat masyarakat Indonesia akrab dengan penggunaan tumbuhan sebagai obat herbal. Alasan sederhana menggunakan tumbuhan dibandingkan dengan bahan kimia karena obat herbal memiliki risiko efek samping yang lebih kecil bila dibandingkan dengan obat kimia.

Salah satu tumbuhan yang digunakan untuk obat-obatan yaitu Daun pulutan (*Urena lobata*). Secara medis tumbuhan ini berguna untuk mengatasi gangguan kesehatan seperti radang, diabetes mellitus (DM), malaria, gigitan serangga, dan lain sebagainya. Namun sebelum menggunakan daun pulutan (*Urena lobata*) sebagai bahan obat herbal, tentu harus melalui serangkaian uji klinis terlebih dahulu di laboratorium. Dan terbukti ternyata tumbuhan ini mampu menurunkan kadar glukosa darah pada tikus diabetes.

Meski telah melalui uji klinis, nyatanya keamanan penggunaan daun *U. lobata* sebagai anti diabetes masih belum didapatkan data yang lengkap dan akurat. Maka dibutuhkan penelitian yang lebih komprehensif tentang keamanan *U. lobata*. Caranya yaitu melakukan evaluasi terhadap efek hipoglikemiknya dalam jangka waktu lama. Pengujian ini menunjukkan bahwa *U. lobata* memiliki efek hepatotoksik pada penggunaan jangka lama. Berdasarkan data tersebut maka penggunaan herbal *U. lobata* untuk pengobatan tidak sepenuhnya aman, sehingga perlu dilakukan pengujian toksisitas untuk mengevaluasi keamanannya.

Buku ini hadir sebagai salah satu sarana penelitian tentang daun Pulutan (*Urena lobata*). Konkretnya buku ini melakukan pengujian toksisitas terhadap daun Pulutan (*Urena lobata*). Buku ini direkomendasikan untuk dibaca khususnya bagi kalangan akademisi, dan peneliti.

Daftar Isi

Pengantar Penulis ... v
Pengantar Penerbit ... vii
Daftar Isi ... ix

Bab 1. Pendahuluan ... 1

Daftar Pustaka ... 3

Bab 2. Zat Aktif dalam Ekstrak Daun Pulutan (*Urena lobata*) ... 5

- 2.1 Sistematika *U. lobata* ... 5
- 2.2 Uraian Tanaman ... 6
- 2.3 Khasiat dan Efek Farmakologi ... 7
- 2.4 Pembuatan Ekstrak Daun Pulutan (*U. lobata*) ... 7
- 2.5 Identifikasi Zat Aktif Ekstrak *U. lobata* ... 7
- 2.6 Hasil Analisa Zat Aktif Ekstrak Daun *U. lobata* ... 7

Daftar Pustaka ... 12

Bab 3. Analisa Toksisitas *Urena lobata* secara *In Silico* ... 15

- 3.1 Tingkat Toksisitas Senyawa Aktif *U. lobata* ... 15
- 3.2 Toksisitas Khusus Senyawa Aktif pada *U. lobata* ... 16

Bab 4. Ikan Zebra (*Danio rerio*) sebagai Hewan Coba Uji Toksisitas ... 21

- 4.1 Taksonomi Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 21
- 4.2 Keunggulan Ikan Zebra sebagai Model Toksikologi ... 22
- 4.3 Anatomi dan Embriologi Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 22
- 4.4 Malformasi Organ Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 23

Daftar Pustaka ... 26

Bab 5. Toksisitas Akut *Urena lobata* dengan Ikan Zebra (*Danio rerio*) ... 27

- 5.1 Toksisitas Akut dan Malformasi Organ pada Fase Embrio ... 28
 - 5.1.1 Derajat Toksisitas Akut Dekokta *U. lobata* pada Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 28
 - 5.1.2 Efek Dekokta *U. lobata* pada Luas Perikardium Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 29
 - 5.1.3 Efek Dekokta *U. lobata* pada Denyut Jantung Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 31
 - 5.1.4 Efek Dekokta *U. lobata* pada Luas Area Yolk Sac Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 32
 - 5.1.5 Efek Dekokta *U. lobata* pada Luas Area Mata Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 33
 - 5.1.6 Efek Dekokta *U. lobata* pada Malformasi Somite Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 34
 - 5.1.7 Efek Dekokta *U. lobata* pada *Detachment Tail* Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 35
 - 5.1.8 Efek Dekokta *U. lobata* pada Daya Tetas Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 36
- 5.2 Toksisitas Akut pada Fase Juvenile ... 37
 - 5.2.1 Derajat Toksisitas Akut Dekokta *U. lobata* pada Juvenile Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 37
 - 5.2.2 Efek Dekok *U. lobata* pada Kecepatan Berenang Fase Juvenile Ikan Zebra (*D. rerio*) ... 38
- 5.3 Toksisitas Akut pada Fase Dewasa ... 39
 - 5.3.1 Derajat Toksisitas Akut Dekokta *U. lobata* pada Ikan Zebra (*D. rerio*) Dewasa ... 39
 - 5.3.2 Efek Dekokta *U. lobata* pada Kecepatan Berenang Ikan Zebra (*D. rerio*) Dewasa ... 39

Daftar Pustaka ... 41

Bab 6. Toksisitas Sub Kronik *Urena Lobata* pada Ikan Zebra (*Danio rerio*) ... 43

- 6.1 Toksisitas Sub Kronik Dekokta Daun *U. lobata* pada Fase Juvenile ... 43

- 6.2 Toksisitas Sub Kronik Dekokta Daun *U. lobata* pada Fase Dewasa ... 44
- 6.3 Kecepatan Berenang Juvenile dan Ikan Zebra Dewasa yang Dipapar *U. lobata* ... 45
 - 6.3.1 Fase Juvenile dengan Pemaparan Sub Kronik ... 45
 - 6.3.2 Fase Dewasa dengan Pemaparan Sub Kronik ... 46

Bab 7. Toksisitas Kronik *Urena Lobata* pada Ikan Zebra (*Danio rerio*) ... 49

- 7.1 Toksisitas Kronik Dekokta Daun *U. lobata* ... 49
- 7.2 Efek Paparan Kronik *U. lobata* Histopatologi Lamella Insang ... 51

Daftar Pustaka ... 55

Tentang Penulis ... 57

01- Pendahuluan

Bahan yang dikonsumsi oleh manusia harus memenuhi kriteria aman sesuai persyaratan yang telah ditetapkan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Indonesia. Kriteria aman yang dimaksud adalah harus terbukti aman melalui serangkaian uji toksistas. Uji toksistas adalah suatu evaluasi untuk mengetahui efek toksik suatu bahan pada sistem biologi dan memperoleh data dosis respon yang khas dari suatu bahan uji. Dengan demikian berbagai bahan yang akan diberikan pada manusia baik berupa makanan, obat, obat herbal, kosmetik dan lain-lain harus telah melalui uji toksistas sehingga dapat diketahui keamanannya (*safety*). Dari uji toksistas ini diperoleh data yang memberi informasi tentang derajat bahaya bahan uji jika diberikan pada manusia sehingga dapat ditetapkan dosis penggunaannya demi keamanan penggunaannya pada manusia.

Indonesia memiliki 30.000 jenis tanaman obat dari 40.000 total keseluruhan tanaman obat di dunia. Masyarakat Indonesia memiliki kebiasaan dan kecenderungan menggunakan herbal dibandingkan obat sintetik untuk upaya pengobatan dikarenakan budaya maupun tradisi turun-temurun. Beberapa tanaman obat secara empirik telah digunakan untuk mengatasi gangguan kesehatan seperti radang, diabetes mellitus (DM), malaria, gigitan serangga dan lain sebagainya. Daun pulutan (*Urena lobata*) adalah salah satu herbal yang digunakan masyarakat untuk pengobatan DM secara turun temurun. Dekokta daun *U. lobata* juga telah dilakukan uji pre klinik dan terbukti mampu menurunkan kadar glukosa darah pada tikus diabetes.¹

Penggunaan herbal anti diabetes yang memerlukan jangka waktu lama harus diwaspadai keamanannya.

Keamanan penggunaan daun *U. lobata* sebagai anti diabetes masih belum didapatkan data yang lengkap dan akurat. Penelitian tentang keamanan *U. lobata* yang telah dilakukan adalah evaluasi efek hipoglikemiknya dalam jangka waktu lama ternyata menunjukkan degeneratif sel hepatosit dan peningkatan kadar Aspartat Transaminase (AST).² Pengujian ini menunjukkan bahwa *U. lobata* menunjukkan efek hepatotoksik pada penggunaan jangka lama. Berdasarkan data tersebut maka penggunaan herbal *U. lobata* untuk pengobatan tidak sepenuhnya aman, sehingga perlu dilakukan pengujian toksisitas untuk mengevaluasi keamanannya.

Toksisitas dekotta daun *U. lobata* perlu dilakukan pengujian untuk menjamin keamanannya. *Lethal Dose 50* (LD₅₀) atau *Lethal Concentration 50* (LC₅₀) adalah parameter toksisitas akut dan sub kronik yang menjadi prioritas utama untuk menilai keamanan herbal.³ Nilai LD₅₀ atau LC₅₀ menunjukkan derajat toksisitas dan dosis yang mampu menimbulkan kematian 50% organisme uji. Perbedaannya LD₅₀ dilakukan pada hewan coba yang hidup di darat sedangkan LC₅₀ pada hewan coba *aquatic*. Toksisitas khusus herbal seperti karsinogenitas, mutagenitas dan teratogenitas juga perlu dilakukan untuk keamanan herbal.⁴ Penelitian juga menguji keamanan herba pada paparan akut, sub kronik dan kronik pada beberapa fase kehidupan serta malformasi organ. Selain itu fungsi organ seperti lokomotor, denyut jantung dan kecepatan respirasi juga dapat dilakukan. Sampai saat ini keamanan penggunaan *U. lobata* masih belum pernah dilakukan uji toksisitas umum maupun khusus.

Daftar Pustaka

1. Purnomo Y, Soeatmadji DW, Sumitro SB, Widodo MA. Anti-hiperglycemic effect of *Urena lobata* leaf extract by inhibition of dipeptidyl peptidase IV on diabetic rat. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 2015;7(5):1073-1079.
2. Omonkhua AA, Onoagbe IO. Long-term effects of three hypoglycaemic plants (*Irvingia gabonensis*, *Urena lobata* and *Carica papaya*) on the oxidative status of normal rabbits. International Journal of the Nigerian Society for Experimental Biology. 2012;24(2):82-89.
3. Mutschler. Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. Unter mitarb. von Schäfer-Korting. -7völlig neu bearb. und erw. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; 1999. p. 6 dengan modifikasi.
4. Nadeem A. Teratology in Zebrafish Embryos: A Tool for Risk Assessment. Uppsala: Master of Science Programme in Veterinary Medicine for International Students Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences; 2007.

02-

Zat Aktif dalam Ekstrak Daun Pulutan (*Urena lobata*)

Tanaman berkhasiat obat salah satunya adalah daun pulutan (*Urena lobata*). Tanaman ini hidup di daerah tropis salah satunya di Indonesia dan tumbuh liar di halaman, ladang, tanah kosong dan tempat-tempat yang banyak sinar matahari. Masyarakat telah menggunakan daun pulutan (*Urena lobata*) secara tradisional untuk pengobatan beberapa penyakit. Aktifitas herbal tersebut dikendalikan oleh senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. Adakalanya senyawa aktif ini dapat menjadi toksik pada dosis tertentu. Oleh karena itu kita perlu melakukan identifikasi senyawa aktif dalam daun pulutan (*Urena lobata*) yang beresiko menimbulkan efek toksik.

2.1 Sistematika *U. lobata*

Kerajaan	: Plantae
Ordo	: Malvales
Famili	: Malvaceae
Sub Famili	: Malvoideae
Bangsa	: Hibisceae
Genus	: <i>Urena</i>
Spesies	: <i>Urena lobata</i>

Nama Lokal : Pungpfulutan, Pungpulutan Awewe, Pungpurutan (Sunda); Legetan, Pulutan, Pulutan Kebo, Pulutan Sapi (Jawa); Polot (Madura); Kapuhak, Kaporata (Sumba); Bejak, Kakamomoko, Kokomomoko (Halmahera); Taba Toko (Ternate); Di Tao Hum (China).

2.2 Uraian Tanaman

Jenis tumbuhan berserat dari suku kapas-kapasan, tumbuh di daerah iklim tropik termasuk di Indonesia. Tumbuh liar di halaman, ladang, tanah kosong dan tempat-tempat yang banyak sinar matahari sampai setinggi ± 1.800 m di atas permukaan laut. Tumbuhan perdu tegak yang bercabang banyak ini mempunyai batang dan tangkai yang liat sehingga sukar dipatahkan dan seluruh tanaman ditumbuhi rambut halus, tinggi dapat mencapai 1 m. Daun tunggal, berlekuk menjari 3,5 atau 7, tumbuh berseling, panjang 3-8 cm, lebar 1-6 cm, tepi bergigi, warna daun bagian atas hijau, bagian bawah hijau muda, pangkal daun membulat, ujung runcing. Bunga berwarna ungu, keluar dari ketiak daun. Buahnya bulat, penampang ± 5 mm, berambut seperti sikat, beruang 5, tiap ruangan berisi 1 biji.¹



Gambar 2.1 Herba tanaman pulutan (*Urena lobata*)

2.3 Khasiat dan Efek Farmakologi

Berdasarkan data empirik ekstrak daun dan akar *U. lobata* digunakan secara tradisional untuk pengobatan demam, malaria, kolik, sakit gigi, *rheumatic* dan *gonorrhea*.¹ *U. lobata* juga digunakan secara tradisional untuk pengobatan DM.² Penduduk Nigeria menggunakan ekstrak akar dan daun *U. lobata* untuk mengobati DM yang dikonsumsi dalam jangka waktu lama.³ *U. lobata* digunakan sebagai obat luar untuk pengobatan bisul, luka berdarah dan koreng.

Pada uji pra klinik, pemberian ekstrak akar *U. Lobata* menunjukkan efek anti diabetes pada tikus DM yang diinduksi streptozotocin.³ Ekstrak metanol akar *U. lobata*⁴ dan beberapa ekstrak kasar daun dan akar serta fraksi beberapa pelarut menunjukkan aktifitas antibakteri.¹

2.4 Pembuatan Ekstrak Daun Pulutan (*U. lobata*)

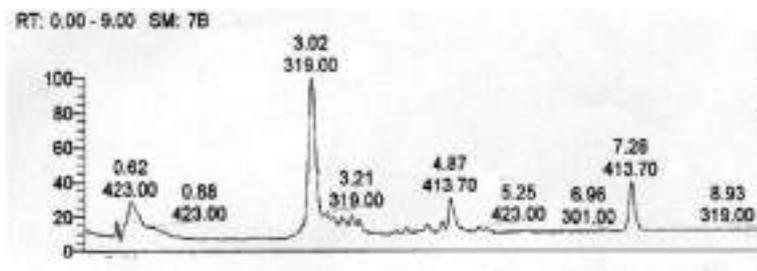
Simplisia daun *U. lobata* didapatkan dari Balai Materia Medika Batu Malang dengan surat keterangan determinasi No. 074/027/101.8/2015. Ekstrak air dibuat secara dekoktasi dengan cara serbuk *U. lobata* 50 g dalam 250 ml air dipanaskan pada suhu 90°C selama 30 menit. Ekstrak dievaporasi dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental berbentuk pasta.

2.5 Identifikasi Zat Aktif Ekstrak *U. lobata*

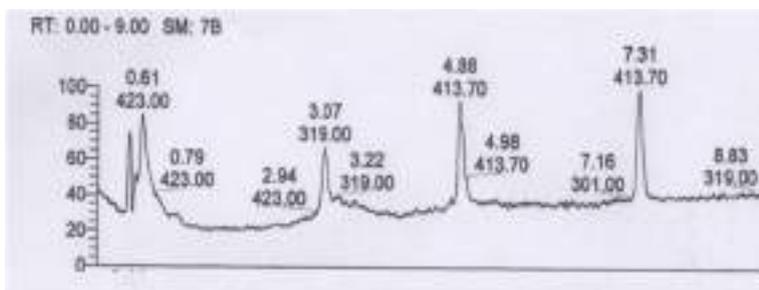
Ekstrak air dan etanol daun *U. lobata* dianalisa semi kualitatif dengan *Liquid Chromatography* detektor *Mass Spectra* (LC-MS) dengan pompa Accela 1250. Fase gerak digunakan campuran metanol dan air dengan kandungan asam format 0,1%. Identifikasi dilakukan pada 10 zat aktif dari kelompok alkaloid, flavonoid, dan fitosterol.

2.6 Hasil Analisa Zat Aktif Ekstrak Daun *U. lobata*

Analisa zat aktif dalam ekstrak daun pulutan (*U. lobata*) dapat dilihat pada **Gambar 2.2**, **Gambar 2.3**, dan **Tabel 2.1**.



Gambar 2.2 Kromatogram zat aktif dalam ekstrak air *U. lobata*



Gambar 2.3 Kromatogram zat aktif dalam ekstrak etanol *U. lobata*

Tabel 2.1 Identifikasi zat aktif dalam ekstrak *U. lobata*

No	Zat Aktif	Berat Molekul	Ekstrak Air <i>U. lobata</i>	Ekstrak Etanol <i>U. lobata</i>
1	Stigmasterol	413	(++)	(+++)
2	B-Sitosterol	415	(+)	(+)
3	Mangiferin	423	(+)	(++)
4	Quercetine	303	(-)	(-)
5	Kaempferol	286	(-)	(-)
6	Hypolaetin	302	(-)	(-)
7	Gossypetin	318	(+++)	(+)
8	Luteolin	286	(-)	(-)
9	Apigenin	270	(-)	(-)
10	Chrysoeriol	300	(+)	(+)

Analisa semi kualitatif ekstrak air dan etanol *U. lobata* dengan metode *Liquid Chromatography-Mass Spectra* (LC-MS) menunjukkan komposisi zat aktif yang besar adalah stigmasterol, gossypetin, dan β -sitosterol. Senyawa aktif seperti mangiferin dan chrysoeriol ter-

didentifikasi dalam ekstrak air dan etanol *U. lobata* tetapi kadarnya relatif rendah.

Ada 5 senyawa aktif yang teridentifikasi dalam ekstrak *U. lobata* dan ditemukan baik dalam ekstrak air maupun etanol. Perbedaan hanya dalam kadar atau komposisi senyawa aktif pada kedua ekstrak yaitu stigmasterol, gossypetin, β -sitosterol, mangiferin, dan chrysoeriol. Senyawa aktif tersebut dikelompokkan dalam metabolit sekunder dan memiliki aktifitas biologis yang dapat digunakan untuk pengobatan penyakit.

Stigmasterol adalah salah satu kelompok sterol tanaman atau fitosterol yang secara struktur kimia mirip dengan kolesterol hewani. Fitosterol tak larut dalam air tapi larut dalam pelarut organik dan mengandung satu kelompok fungsional alkohol. Stigmasterol merupakan sterol tak jenuh pada tanaman seperti kedelai dan beberapa tanaman obat. Uji pra klinik pada hewan yang disuplementasi stigmasterol menunjukkan bahwa absorpsi kolesterol dan sitosterol menurun 23% dan 30% berturut-turut selama 6 minggu. Senyawa stigmasterol juga memiliki potensi sebagai antioksidan, anti-hiperglikemik, dan anti-thyroid.^{5,6}

Gossypetin adalah flavonol atau flavon yang merupakan salah satu jenis flavonoid. Senyawa ini diisolasi dari bunga dan kelopak bunga sepatu atau spesies hisbicus. Gossypetin menunjukkan potensi kuat sebagai antioksidan, anti-mikroba, anti-mutagenik, dan anti-atherosklerosis.⁷ Senyawa ini sangat larut dalam kloroform dan benzena serta sedikit larut dalam etanol dan eter tapi tak larut dalam air.

β -sitosterol adalah satu dari beberapa fitosterol dengan struktur mirip kolesterol. Sterol merupakan molekul turunan isoprenoid yang memiliki fungsi penting pada sel eukariot dan tanaman tingkat tinggi. β -sitosterol berwarna putih menyerupai serbuk lilin dengan aroma khas. Senyawa ini bersifat hidrofobik dan larut dalam etanol dan kloroform tapi tidak larut dalam air.⁸ β -sitosterol dapat ditemukan pada buah alpukat, minyak jagung, dan kedelai serta menunjukkan efek anti-kolesterol, anti-inflamasi, dan imunomodulator.⁹

Mangiferin adalah xanthonoid dan glukosida norathyriol. Senyawa ini dapat ditemukan pada buah *Garcinia mangostana*, *Iris*

unguicularis, dan *Anemarrhena asphedelos*. Mangiferin larut dalam etanol dan metanol encer panas tapi tak larut dalam air. Studi laboratorium menunjukkan beberapa efek farmakologi dari mangiferin yaitu anti-mikroba, antioksidan, dan anti-diabetes pada hewan coba.^{10,11}

Chrysoeriol adalah flavone, salah satu kelompok flavonoid utama. Senyawa ini memiliki beberapa efek yang menguntungkan bagi kesehatan seperti anti-inflamasi dan anti-histamin. Chrysoeriol larut dalam larutan alkali dan cukup larut dalam air.^{12,13}

Keberadaan zat aktif dalam ekstrak tanaman obat dipengaruhi oleh polaritas dan jenis pelarut penyari. Komposisi zat aktif dalam ekstrak ditentukan oleh jenis pelarut yang digunakan yaitu adanya perbedaan kelarutan zat aktif dalam pelarut. Kedua, polaritas senyawa aktif juga berkontribusi dalam kelarutannya dalam pelarut. Alkaloid, terpenoid, dan steroid larut dalam pelarut non polar seperti acetone, eter, dan heksan. Sementara flavonoid, fenol, dan glikosida larut dalam pelarut polar seperti air dan methanol.^{14,15} Keadaan ini sesuai dengan ketentuan dalam teori kelarutan yaitu "*like dissolve like*" bahwa senyawa polar larut dalam pelarut polar dan begitu pula sebaliknya.^{15,16}

Pada umumnya, herbal mengandung dua senyawa utama yaitu nutrisi dan non nutrisi. Metabolit primer atau senyawa nutrisi seperti karbohidrat, protein, asam lemak, dan fitosterol ditemukan dalam jumlah besar tapi tidak memiliki efek farmakologi. Sebaliknya, senyawa non nutrisi atau metabolit sekunder seperti alkaloid, terpenoid, flavonoid, dan steroid dijumpai dalam jumlah kecil tapi memiliki aktifitas farmakologi pada dosis tertentu.^{13,16} Metabolit sekunder berasal dari metabolisme metabolit primer dalam tanaman tetapi beberapa memiliki efek toksik khususnya bila digunakan dalam dosis besar. Sebagian besar flavonoid dan terpenoid dalam tanaman memiliki potensi sebagai antioksidan, antiseptik, dan anti-inflamasi sedangkan steroid sebagai anti-inflamasi dan hormon sex. Alkaloid dalam tanaman sulit diprediksi potensinya karena memiliki beberapa aktifitas biologi.¹⁷

Efek anti-diabetik herbal ditandai potensinya menurunkan kadar glukosa darah. Efek hipoglikemik dikendalikan oleh senyawa aktif seperti terpenoid, steroid, alkaloid, dan flavonoid tetapi mekanisme kerjanya berbeda. Beberapa tanaman obat bekerja sebagai anti-

diabetes dengan mekanisme meningkatkan sensitivitas insulin, sekresi insulin, inhibisi DPP-IV, dan α -glucosidase.¹⁸ Herba anti-diabetik memiliki beberapa senyawa aktif sehingga memiliki kemungkinan untuk bekerja melalui beberapa aksi dan menghasilkan interaksi baik yang bersifat sinergistik maupun antagonistik.

Daftar Pustaka

1. Adeloje OA, Akinpelu AD, Ogundaini OA, Obatemi C. Studies of Antimicrobial, Antioxidant and Phytochemical Analysis of *Urena lobata* Leave Extract. J. Phys. Nat Sci. 2007;1(2):1-9.
2. Lans CA. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. J Ethnobiol Ethnomed. 2006;13(2):45. DOI: 10.1186/1746-4269-2-45.
3. Onoagbe IO, Negbenebor EO, Ogbeide VO, Dahwa IH, Attah V, Lau HU, *et al.* A study of the anti-diabetic effects of *Urena lobata* and *Sphenostylis stenocarpa* in streptozotocin-induced diabetic rats. European. Journal Science Res. 2010;43:6-14.
4. Mazunder UK, Gupta M, Manikandan L, Bhattacharya S. Anti-bacterial activity of *Urena lobata* root. Fitoterapia. 2002;72(8): 927-929.
5. Panda S, Jafri M, Kar A, Meheta BK. Thyroid inhibitory, anti-oxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*. Fitoterapia. 2009;80:123-126. 10.1016/j.fitote.2008.12.002.
6. Ros MM, Sterk SS, Verhagen H, Stalenhoef AF, de Jong N. Phytosterol consumption and the anabolic steroid boldenone in humans: a hypothesis piloted. Food Additives Contam. 2007; 24:679-684. DOI: 10.1080/02652030701216727.
7. Chen JH, Tsai CW, Wang CP, Lin HH. Anti-atherosclerotic potential of gossypetin via inhibiting LDL oxidation and foam cells formation. Toxicology and Applied Pharmacology. 2013; 272:313-324. DOI: 10.1016/j.taap.2013.06.027.
8. Saeidnia S, Manayi A, Gohari AR, Abdollahi M. The story of beta-sitosterol-A review. European Journal of Medicinal Plants. 2014;4:590-609. DOI: 10.9734/EJMP/2014/7764.
9. Assmann G, Cullen P, Erbey J, Ramey DR, Kannenberg F, Schulte H. Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study. Nutrition & Metabolism Cardiovascular Diseases. 2006;16:13–21. DOI: 10.1016/j.numecd.2005.04.001.

10. Matkowski A, Kus P, Goralska E, Wozniak D. Mangiferin - a bioactive xanthonoid, not only from mango and not just antioxidant. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 2013;13:439-455.
11. Sellamuthu PS, Arulselvan P, Kamalraj S, Fakurazi S, Kandasamy M. Protective nature of mangifera on oxidative stress and antioxidant status in tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *ISRN Pharmacology*. 2013;13:1-10. DOI: 10.1155/2013/750109.
12. Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, Joshi YC. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy Reviews*. 2011;5:1-12.
13. Amit T, Dinesh S, Rajendra K. The Chemistry and Biology of Bioflavonoids. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2008;1(3):132-143.
14. Çitoglu GS, Acikara O`B. Column chromatography for terpenoids and flavonoids. In: Dhanarasu S, editor. *Chromatography and its applications*. Rijeka: Intech; 2012.
15. House JE. *Inorganic chemistry*. Massachusetts: Academic Press; 2008.
16. Gupta A, Naraniwal M, Kothari V. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *Int J Appl Nat Sci*. 2012;1(1):8-26.
17. Evans WC. *Trease and Evans' pharmacognosy*, 15th ed. London: W.B. Saunders Company Ltd; 2002.
18. Chang CL, Lin Y, Bartolome AP, Chen YC, Chiu SC, Yang WC. Herbal therapies for type 2 diabetes mellitus: chemistry, biology, and potential application of selected plants and compounds. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013. DOI: 10.1155/2013/378657.

03-

Analisa Toksisitas *Urena lobata* secara *In Silico*

Toksisitas daun *U. lobata* dapat dilakukan pengujian secara *in silico* untuk prediksi tingkat toksisitasnya berdasarkan senyawa yang terdapat dalam herbal. Senyawa aktif dalam *U. lobata* yang telah teridentifikasi kemudian dievaluasi toksisitasnya berdasarkan nilai LD₅₀ secara *in silico*.

3.1 Tingkat Toksisitas Senyawa Aktif *U. lobata*

Prediksi tingkat toksisitas senyawa aktif dalam herbal *U. lobata* dapat dicari dari alamat layanan on line dari iLAB ACD: <https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>. Tingkat toksisitas didapatkan hasil seperti yang ada di **Tabel 3.1**.

Tabel 3.1 Analisa toksisitas senyawa aktif dalam *U. lobata* secara *in silico*

No	Senyawa aktif	LD50 (mg/kg) mencit (i.p)	LD ₅₀ (mg/kg) mencit (p.o)	LD ₅₀ (mg/kg) tikus (i.p)	LD ₅₀ (mg/kg) tikus (p.o)
1	Stigmasterol	160**	530*	170**	1400**
2	β -Sitosterol	110**	570*	140*	740*
3	Mangiferin	460*	1500**	160**	1900
4	Gossypetin	490*	550**	710	600*
5	Chrysoeriol	290	1100*	700**	1300**

Keterangan: (): *not reliable*, (*): *borderline*, (**): *moderate*

Stigmasterol dan β -sitosterol mempunyai nilai LD₅₀ yang rendah atau derajat toksisitasnya tinggi baik pada tikus maupun mencit. Pemberian secara intra peritoneal (i.p) menunjukkan nilai LD₅₀ lebih rendah dibandingkan per oral (p.o) baik pada tikus dan mencit. Analisa toksisitas senyawa aktif *U. lobata* sebagian besar menunjukkan tingkat kepercayaan pada area perbatasan dan sedang.

Prediksi tingkat toksisitas senyawa aktif dalam herbal *U. lobata* dapat dicari juga dari alamat layanan *online* dari <http://www.way2drug.com/gusar/acutoxpredict.html>. Adapun hasil dapat dilihat pada **Tabel 3.2**.

Tabel 3.2 Nilai LD₅₀ pada tikus dengan beberapa rute pemberian

Zat Aktif	Rat i.p LD ₅₀ (mg/kg BB)	Rat i.v LD ₅₀ (mg/kgBB)	Rat Oral LD ₅₀ (mg/kg BB)	Rat s.c LD ₅₀ (mg/kg BB)
Stigmasterol	786,100	0,838*	62,920*	342,700
β -Sitosterol	896,700	5,876	1280,000	838,700
Mangiferin	730,500	1380,000	1175,000*	2611,000
Gossypetin	897,500	393,300	1434,000	2018,000
Chrysoeriol	777,300	1943,000*	2629,000	3866,000

Catatan (*): senyawa berada diluar domain penerapan model

Senyawa β -sitosterol memiliki derajat toksisitas paling tinggi berdasarkan nilai LD₅₀ dengan rute pemberian i.v diikuti gossypetin. Stigmasterol sebenarnya juga lebih toksik dibandingkan β -sitosterol tetapi kondisi riset berada diluar domain penerapan model.

3.2 Toksisitas Khusus Senyawa Aktif pada *U. lobata*

Prediksi toksistas khusus yitu karsinogenik dan mutagenic dapat dicari dari alamat layanan on line dari <https://lazar.in-silico.ch/predict>. Adapun hasil dapat dilihat pada **Tabel 3.3**.

Tabel 3.3 Analisa toksisitas khusus (karsinogenik & mutagenik) senyawa *U. lobata*

Senyawa	Toksitas akut (<i>D. magna</i>)	Karsinogenitas (mencit)	Karsinogenitas (tikus)	Karsinogenitas (pengerat)	Lowest Observed	Mutagenicity <i>S. thypi</i>
Stigmasterol	Tipe: Regresi Prediksi: 0.0265 (mmol/L) 10.9 (mg/L) 95% interval prediksi: -- Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Tipe: Klasifikasi Prediksi: non-karsinogenik Probabilitas: non- karsinogenik: 0.298 karsinogenik: 0.102 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Tipe: Classification Prediksi: karsinogenik Probabilitas: karsinogenik: 0.315 non- karsinogenik: 0.133 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Tipe: Classification Prediksi: karsinogenik Probabilitas: karsinogenik: 0.301 non- karsinogenik: 0.147 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Peringatan: Tidak dapat membuat predisi: hanya satu senyawa serupa untuk threshold 0.2 dalam serangkaian percobaan (Threshold: 0.2).	Tipe: Classification Prediksi: non-mutagenik Probabilitas: non- mutagenik: 0.679 mutagenik: 0.0 Kepercayaan: Sama dengan hasil bioassay
B-Sitosterol	Tipe: Regresi Prediksi: 0.0178 (mmol/L) 7.39 (mg/L) 95% interval prediksi: -- Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Tipe: Klasifikasi Prediksi: non-karsinogenik Probabilitas: non- karsinogenik: 0.341 non- carcinogenik: 0.145 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Tipe: Classification Prediksi: karsinogenik Probabilitas: karsinogenik: 0.341 non- karsinogenik: 0.146 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Tipe: Classification Prediksi: karsinogenik Probabilitas: karsinogenik: 0.326 non- karsinogenik: 0.161 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Peringatan: Tidak dapat membuat predisi: hanya satu senyawa serupa untuk threshold 0.2 dalam serangkaian percobaan (Threshold: 0.2).	Tipe: Classification Prediksi: non-mutagenik Probabilitas: mutagenik: 0.155 non- mutagenik: 0.845 Kepercayaan: Sama dengan hasil bioassay
Mangiferin	Peringatan: Tidak dapat menemukan senyawa serupa untuk threshold 0.2 dalam serangkaian percobaan	Tipe: Klasifikasi Prediksi: non-karsinogenik Probabilitas: non- karsinogenik: 0.286 karsinogenik: 0.0 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Tipe: Klasifikasi Prediksi: non- karsinogenik Probabilitas: non- karsinogenik: 0.231 karsinogenik: 0.0546 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Tipe: Klasifikasi Prediksi: non- karsinogenik Probabilitas: non- karsinogenik: 0.231 karsinogenik: 0.0546 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Peringatan: Tidak dapat membuat predisi: hanya satu senyawa serupa untuk threshold 0.2 dalam serangkaian riset (Threshold: 0.2).	Tipe: Classification Prediksi: mutagenik Probabilitas: non- mutagenik: 0.193 mutagenik: 0.207 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay

Gossypetin	Type: Regresi Prediksi: 0.0101 (mmol/L) 3.22 (mg/L) 95% interval prediksi: -- Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Type: Klasifikasi Prediksi: non-karsinogenik Probabilitas: non-karsinogenik: 0.631 karsinogenik: 0.147 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Type: Klasifikasi Prediksi: non-karsinogenik Probabilitas: non-karsinogenik: 0.5 karsinogenik: 0.277 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Type: Klasifikasi Prediksi: non-karsinogenik Probabilitas: non-karsinogenik: 0.5 karsinogenik: 0.277 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Type: Regresi Prediksi: 4.56 (mmol/kg_ bw/day) 1450.0 (mg/kg_ bw/day) 95% interval prediksi: 0.926 - 22.4 (mmol/kg_ bw/day) 295.0 - 7140.0 (mg/kg_ bw/day) Confidence: Lower than bioassay results	Type: Classification Prediction: mutagenic Probabilitas: non-mutagenik: 0.35 mutagenik: 0.427 Confidence: Similar to bioassay results
Chrysoeriol	Type: Regresi Prediksi: 0.131 (mmol/L) 39.4 (mg/L) 95% interval prediksi: 0.00942 - 1.83 (mmol/L) 2.83 - 549.0 (mg/L) Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Type: Klasifikasi Prediksi: non-karsinogenik Probabilitas: non-karsinogenik: 0.444 karsinogenik: 0.192 Kepercayaan: Lebih rendah dari hasil bioassay	Type: Klasifikasi Prediksi: non-karsinogenik Probabilitas: non-karsinogenik: 0.41 karsinogenik: 0.226 Kepercayaan: Sama dengan hasil bioassay	Type: Klasifikasi Prediksi: non-karsinogenik Probabilitas: non-karsinogenik: 0.41 karsinogenik: 0.226 Kepercayaan: Sama dengan hasil bioassay	Peringatan: Tidak dapat membuat prediksi: hanya satu senyawa serupa untuk threshold 0.2 dalam serangkaian riset (Threshold: 0.2).	Type: Classification Prediction: mutagenic Probabilitas: non-mutagenik: 0.373 mutagenik: 0.469 Kepercayaan: Sama dengan hasil bioassay

Prediksi toksistas khusus yaitu karsinogenik pada tikus atau mencit dengan gender berbeda serta tingkat toksisitas nya pada berbagai sistem organ dapat dicari dari alamat layanan on line <https://www.way2drug.com/ROSC/>. Adapun hasil dapat dilihat pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4. Analisa toksisitas khusus (karsinogenik) senyawa *U. lobata*

	Jantan (pa)	Jantan (pi)	Jantan Organ	Betina (pa)	Betina (pi)	Betina Organ
Stigmasterol						
Mencit	0.576	0.091	lung	0.655	0.085	hematopoietic system
				0.520	0.106	lung
B-sitosterol						
Mencit	0.726	0.021	lung	0.713	0.049	hematopoietic system
				0.582	0.069	lung
Mangiferin						
Tikus	0.434	0.095	vascular system	0.312	0.213	small intestine
	0.470	0.360	kidney			
Mencit	0.415	0.248	kidney	0.316	0.283	pituitary gland
Gossypetin						
Tikus	0.965	0.004	urinary bladder	0.939	0.005	urinary bladder
	0.961	0.014	kidney	0.772	0.019	small intestine
	0.390	0.241	stomach			
	0.334	0.195	vascular system			
Mencit	0.565	0.170	stomach	0.508	0.052	pituitary gland
				0.439	0.290	thyroid gland
Chrysoeriol						
Tikus	0.962	0.004	urinary bladder	0.943	0.005	urinary bladder
	0.968	0.011	kidney	0.594	0.053	small intestine
	0.600	0.082	stomach	0.480	0.179	stomach
	0.411	0.112	vascular system			
	0.298	0.179	large intestine			
Mencit	0.766	0.065	stomach	0.404	0.153	pituitary gland
	0.505	0.203	urinary bladder	0.369	0.275	liver
	0.316	0.305	liver			

04-

Ikan Zebra (*Danio rerio*) sebagai Hewan Coba Uji Toksistas

Pengujian toksistas herbal dapat dilakukan dengan menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*). Ikan zebra memiliki 70% kode protein yang berhubungan dengan gen manusia dan sekitar 84% gen ikan zebra diketahui berhubungan dengan penyakit manusia.¹ Penggunaan ikan dewasa dan embrio ikan zebra untuk uji toksistas memiliki keunggulan seperti murah, mudah didapat, sensitif, dapat digunakan sebagai bioindikator polutan dan memiliki tingkat prediksi yang tinggi.²

4.1 Taksonomi Ikan Zebra (*D. rerio*)



Gambar 4.1 *Danio rerio*

Kerajaan : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Actinopterygii
Ordo : Cypriniformes
Famili : Cyprinidae
Genus : *Danio*
Spesies : *D. rerio*

4.2 Keunggulan Ikan Zebra sebagai Model Toksikologi

Ikan zebra dan jenis spesies ikan akuarium lainnya memiliki keuntungan yang berbeda sebagai model untuk penelitian biomedis salah satunya memiliki biaya perawatan yang lebih rendah daripada hewan mamalia lainnya. Spesies *Oviparous* termasuk ikan zebra melakukan fertilisasi dan perkembangan embrio secara eksternal sehingga memberikan kemudahan untuk observasi dan manipulasi pada embrio. Spesies ikan *Oviparous* dapat dikloning dengan mudah, memungkinkan manipulasi genetik untuk studi haploids, triploids, atau tetraploids dengan androgenesis atau gynogenesis.³

Perawatan ikan zebra mudah cukup ditempatkan akuarium dengan sistem sirkulasi udara yang baik, serta dengan mudah berkembang biak terus menerus sepanjang tahun, dan memiliki kali perkembangan generasi singkat sekitar 3-5 bulan.⁴ Ukuran kecil ikan zebra dewasa memungkinkan efisiensi dari biaya yang murah serta evaluasi semua organ besar pada sejumlah slide. Ukuran kecil dari embrio dan juvenile dapat meminimalkan biaya dan volume untuk obat dan racun yang akan di induksi studi. Dengan demikian jumlah metabolit mahal atau obat yang ditargetkan baru bisa dengan cepat dievaluasi.⁵

4.3 Anatomi dan Embriologi Ikan Zebra (*D. rerio*)

Ikan zebra (*Danio rerio*) merupakan ikan air tawar asli India dan Asia selatan termasuk Indonesia yang memiliki panjang tubuh hingga 4,5 cm dan bergaris horizontal putih perak dan biru pada

oleh OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*) untuk pengujian toksisitas bahan kimia. Ikan zebra (*Danio rerio*) telah digunakan secara luas digunakan sebagai model spesies untuk perkembangan biologi. Spesies ini dalam ukuran kecil (panjang 3-5 cm), mudah diperoleh, murah, mudah dipelihara, dalam kondisi yang sesuai dapat menghasilkan telur dengan jumlah yang besar dan transparan. Satu betina dapat menghasilkan sekitar 50 sampai 200 telur per hari.

Morfologi dan dasar molekul jaringan dan pengembangan organ pada ikan zebra pada umumnya identik atau mirip dengan vertebrata lainnya. Genom ikan zebra memiliki kesamaan yang besar dengan genom manusia begitu banyak gen yang berhubungan dengan perkembangan maupun penyakit pada manusia yang memiliki kesamaan dengan gen di ikan zebra. Genom ikan zebra sebanyak 1700 juta pasangan basa panjang, sekitar hampir setengah dari jumlah genom pada manusia. Kebanyakan manusia memiliki gen yang homolog dengan ikan zebra serta domain fungsional dari proteinnya seperti domain protein sebagai ATP binding kinase hampir 100% identik, meskipun kesamaan di seluruh protein sekitar 60%. Sebagai besar fungsi protein berada dalam domain fungsional di mana obat-obatan sering terikat, model ikan zebra adalah model yang sangat valid untuk mempelajari efek obat pada manusia. Pelarut, dispersan minyak, pestisida, dan logam yang dikenal untuk mempengaruhi perkembangan ikan dengan cara merusaknya.

Tabel 4.1 Parameter efek malformasi organ pada ikan zebra²

Organ	Efek	Organ	Efek
Sirip	Sirip Iregular	Ekor	Ekor Terlipat
	Sirip Kerdil		Ekor Pendek
	Tidak Memiliki Sirip		Ekor tidak terlepas dari yolk sac
Kepala	Brachycephalic	Jantung	Bradycardia
	Microcephalic		Takikardia
	Dolichocephalic/ beak face		Acardia

Mata	Microphthalmia	Bentuk Tubuh	Pembesaran jantung
	Edema okular		Tumor/Lumps
Tulang Belakang	Scoliosis		Tubuh Seperti Belut
	Lordosis	Pertumbuhan Kerdil	
Pergerakan	Pergerakan Lambat	Warna tubuh	Ikterus
	Tidak Ada Pergerakan		Hemorrhage

Daftar Pustaka

1. Martin V, Roger VE. The Use of the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo for the Acute Toxicity Testing of Surfactants, as a Possible Alternative to the Acute Fish Test *AstraZeneca*, Brixham Environmental Laboratory, Brixham. UK. UK: 2SEAC, Unilever, Colworth, Sharnbrook, Bedford; 2010.
2. Stephanie P. Office of Research and Development National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Integrated Systems Toxicology Division. 2012.
3. Corley-Smith GE, Brandhorst BP, Walker C, Postlethwait JH. Production of haploid and diploid androgenetic zebrafish (including methodology for delayed in vitro fertilization). *Methods Cell Biol.* 1999;59:45-60.
4. Detrich HW, Westerfield M, Zon LI. Overview of the Zebrafish system. *Methods Cell Biol.* 1999;59:3-10.
5. Fournie JW, Hawkins WE, Krol RM, Wolfe MJ. Preparation of whole small fish for histological evaluation. In: *Techniques in Aquatic Toxicology*, Ostrander GM (ed). Boca Raton, Florida: Lewis Publishers; 1996. p. 577-588.
6. Heidenwag I, Langheinrich U, Lüderitz V. Self-Purification in Upland and Lowland Streams, *Acta Hydroch. Hydrob.* 2001;1 (29):22-33.

05-

Toksisitas Akut *Urena lobata* dengan Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Pengujian toksisitas herbal dapat dilakukan dengan menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*). Ikan zebra memiliki 70% kode protein yang berhubungan dengan gen manusia dan sekitar 84% gen ikan zebra diketahui berhubungan dengan penyakit manusia.¹ Penggunaan ikan dewasa dan embrio ikan zebra untuk uji toksisitas memiliki keunggulan seperti murah, mudah didapat, sensitif, dapat digunakan sebagai bioindikator polutan, dan memiliki tingkat prediksi yang tinggi.² Berdasarkan latar belakang diatas maka perlu dilakukan pengujian toksisitas akut dan sub kronik dekoka daun pulutan (*U. lobata*) dengan menentukan nilai *Lethal Concentration 50* (LC₅₀), aktifitas motorik, dan malformasi organ pada beberapa fase kehidupan.

5.1 Toksisitas Akut dan Malformasi Organ pada Fase Embrio

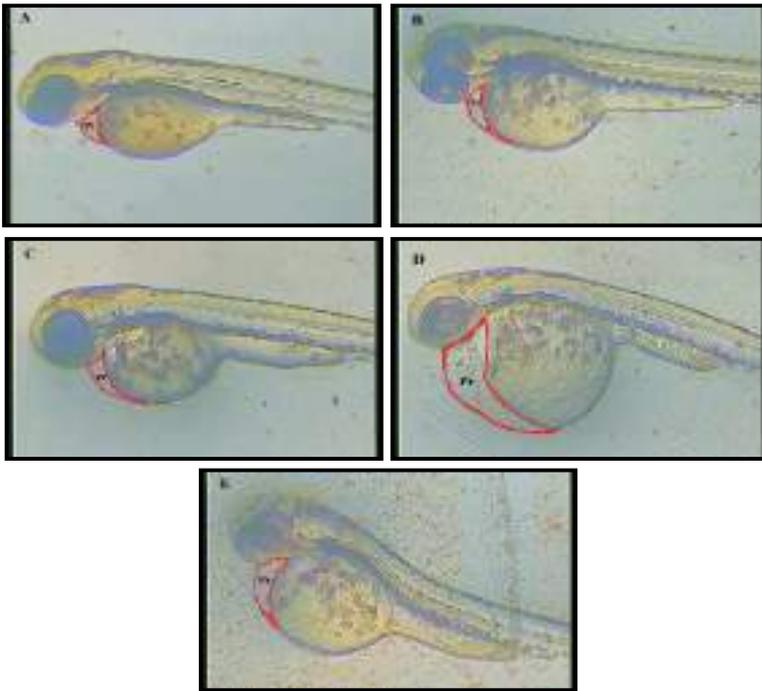
5.1.1 Derajat Toksisitas Akut Dekokta *U. lobata* pada Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*)

Tabel 5.1 Nilai LC₅₀ dekokta *U. lobata* akut pada embrio ikan *D. rerio*

No	Konsentrasi (mg/L)	X ± SD Kematian (%)
1	1000	0.00 ± 0.00
2	1500	1.33 ± 0.00
3	2500	50.00 ± 0.00
4	3000	70.00 ± 0.00
5	4000	100.00 ± 0.00
	Y=0.0358x -41.24 LC ₅₀ = 2548.79 mg/L	Toksisitas: Derajat sedang

Toksisitas dekokta *U. lobata* pada fase embrio masuk kategori sedang. Efek tersebut dipengaruhi oleh komposisi zat aktif *U. lobata* seperti alkaloid, saponin, dan tanin. Beberapa alkaloid bersifat sitotoksik yang bekerja menghambat mitosis pada siklus pembelahan sel sehingga menimbulkan kematian pada sel. Saponin bersifat mengganggu permeabilitas sel darah sehingga terjadi hemolisis yang berlanjut pada kondisi hipoksia. Tanin mengganggu enzim pembentuk sel dan proses pencernaan sehingga menimbulkan defisiensi nutrisi. Pada fase embrio terjadi pertumbuhan yang pesat dan beberapa organ dan enzim belum berkembang sempurna sehingga lebih rentan terhadap senyawa xenobiotik seperti herbal ini.

5.1.2 Efek Dekokta *U. lobata* pada Luas Perikardium Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*)

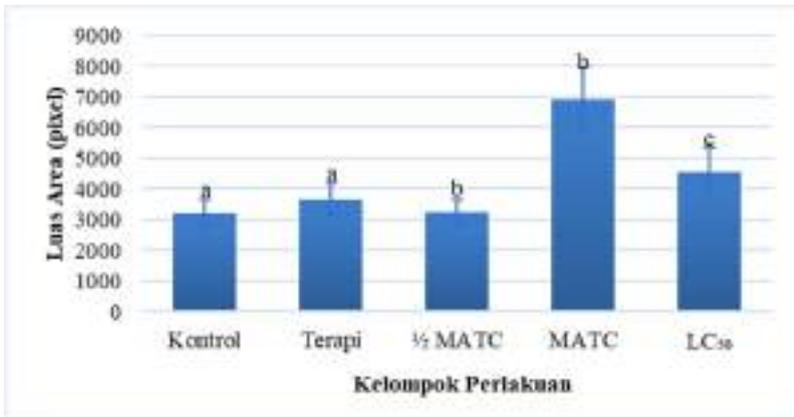


Gambar 5.1 Luas area perikardium embrio ikan zebra perbesaran 4.5x pengolahan dengan *software ImageJ*. (A) Kelompok kontrol, (B) Dosis terapi mengalami peningkatan tidak signifikan, (C) Dosis $\frac{1}{2}$ MATC mengalami peningkatan tidak signifikan, (D) Dosis MATC mengalami peningkatan paling kuat, (E) Dosis LC_{50} mengalami peningkatan signifikan. Pr = *Perikardium*, garis merah menandakan luas area perikardium.

Tabel 5.2 Luas area perikardium embrio *D. rerio* yang dipapar akut *U. lobata*

Perlakuan	n	X \pm SD
		Luas area perikardium (pixel)
Kontrol	6	3220 \pm 441 ^a
Dosis Terapi (500 mg/L)	6	3665 \pm 507 ^a
Dosis $\frac{1}{2}$ MATC (875 mg/L)	6	3239 \pm 423 ^b
Dosis MATC (1750 mg/L)	6	6929 \pm 1056 ^b
Dosis LC_{50} (2500 mg/L)	6	4541 \pm 8050 ^c

Keterangan: a,b,c: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan efek yang signifikan ($p < 0.05$)



Gambar 5.2 Histogram rerata luas area perikardium embrio ikan zebra

Pemberian DUL dosis MATC, dan LC₅₀ meningkatkan secara signifikan luas area perikardium embrio ikan zebra berturut-turut sekitar 100% dan 40% dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$), sedangkan dosis terapi dan ½ MATC tidak meningkatkan signifikan luas area perikardium ($p > 0,05$). DUL dosis MATC dan LC₅₀ berbeda signifikan meningkatkan luas area perikardium ($p < 0,05$), sedangkan dosis terapi dan ½ MATC tidak berbeda dalam meningkatkan luas perikardium ($p > 0,05$).

Peningkatan luas area perikardium kemungkinan dikendalikan senyawa flavonoid yang mengalami autoksidasi menjadi radikal hidroksil yang sangat reaktif. Senyawa tersebut dapat merusak komponen biokimia sel seperti protein, lipid dan asam nukleat. Komponen protein yang mengatur siklus sel seperti *Cyclin-dependent kinases* (CDKs) mengalami gangguan akibat kerusakan oksidatif sehingga akan meningkatkan proliferasi sel.

Senyawa alkaloid juga berperan terhadap peningkatan luas area perikardium melalui gugus basa yang mengandung nitrogen dan mampu bereaksi dengan senyawa asam amino dalam sel sehingga terjadi jejas sel. Keadaan ini menginduksi proses inflamasi dan pelepasan mediator inflamasi sehingga terjadi tanda-tanda inflamasi seperti tumor, calor, rubor, dan dolor. Mediator inflamasi juga berperan meningkatkan permeabilitas sehingga ekstrasvasi ke jaringan sehingga terjadi pembesaran atau tumor pada perikardium.

5.1.3 Efek Dekokta *U. lobata* pada Denyut Jantung Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*)

Tabel 5.3 Denyut jantung embrio *D. rerio* yang dipapar akut dekokta *U. lobata*

Perlakuan	n	X ± SD Denyut jantung (denyut/menit)
Kontrol	6	191.00 ± 5.76 ^a
Dosis Terapi (500 mg/L)	6	190.33 ± 3.67 ^a
Dosis ½ MATC (875 mg/L)	6	172.50 ± 10.46 ^b
Dosis MATC (1750 mg/L)	6	166.67 ± 15.97 ^b
Dosis LC ₅₀ (2500 mg/L)	6	114.50 ± 16.12 ^c

Keterangan: a,b,c: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan efek yang signifikan ($p < 0.05$)



Gambar 5.3 Histogram rerata denyut jantung embrio ikan zebra

Pemberian DUL dosis ½ MATC, MATC, dan LC₅₀ menurunkan secara signifikan denyut jantung embrio ikan zebra berturut-turut sekitar 10%, 15%, dan 40% dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$), sedangkan dosis terapi tidak menurunkan signifikan denyut jantung ($p > 0,05$). DUL dosis ½ MATC dan MATC tidak berbeda signifikan menurunkan denyut jantung ($p > 0,05$), sedangkan dosis LC₅₀ paling kuat menurunkan denyut jantung ($p < 0,05$).

Efek ini diduga dikendalikan oleh senyawa alkaloid yang bekerja mendepresi susunan saraf pusat khususnya pada organ jantung. Senyawa alkaloid dapat berinteraksi langsung dengan reseptor muskarinik di

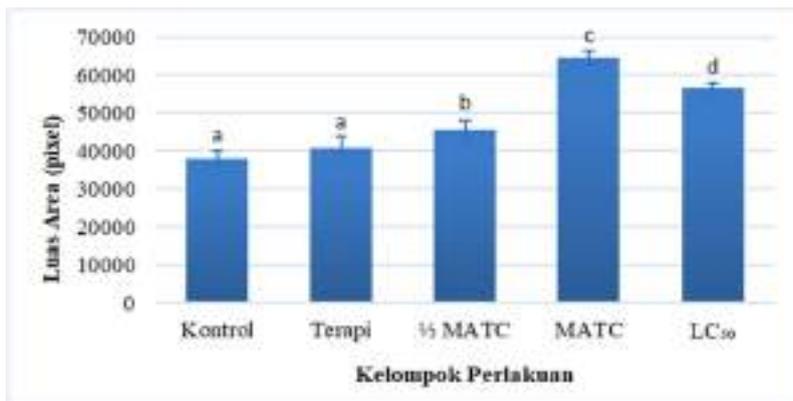
jantung sehingga menurunkan denyut jantung atau *bradikardi*. Efek tersebut terjadi melalui mekanisme peningkatan permeabilitas *nodus SA* terhadap K^+ dari intrasel menuju ekstrasel sehingga terjadi peningkatan kenegatifan dalam intrasel (hiperpolarisasi). Kondisi hiperpolarisasi akan menurunkan nilai potensial aksi sel sehingga menurunkan *heart rate* atau denyut jantung pada embrio ikan zebra.^{3,4}

5.1.4 Efek Dekokta *U. lobata* pada Luas Area Yolk Sac Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*)

Tabel 5.4 Luas area yolk sac embrio *D. rerio* yang dipapar akut dekok *U. lobata*

Perlakuan	n	X ± SD Luas area yolk sac (pixel)
Kontrol	6	38000 ± 2248 ^a
Dosis Terapi (500 mg/L)	6	40789 ± 3174 ^a
Dosis ½ MATC (875 mg/L)	6	45471 ± 2726 ^b
Dosis MATC (1750 mg/L)	6	64570 ± 1859 ^c
Dosis LC ₅₀ (2500 mg/L)	6	56600 ± 1393 ^d

Keterangan: a,b,c,d: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan efek yang signifikan ($p < 0.05$)



Gambar 5.4 Histogram rerata luas area yolk sac embrio ikan zebra

Pemberian DUL dosis ½ MATC, MATC, dan LC₅₀ meningkatkan luas area yolk sac berturut-turut sekitar 20%, 70%, dan 50% dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Efek ini dikendalikan oleh senyawa alkaloid yang bekerja meningkatkan luas area yolk sac

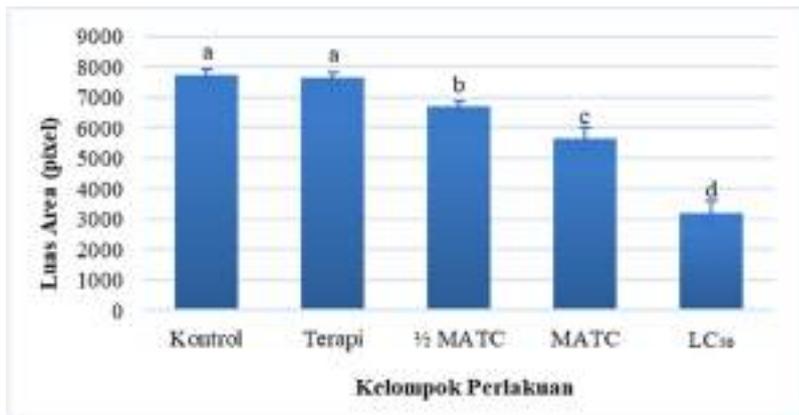
melalui gugus basa yang mengandung nitrogen dan mampu bereaksi dengan senyawa asam amino dalam sel sehingga terjadi jejas sel. Keadaan ini menginduksi proses inflamasi dan pelepasan mediator inflamasi yang berperan meningkatkan permeabilitas sehingga ekstrasvasasi ke jaringan sehingga terjadi pembesaran yolk sac.

5.1.5 Efek Dekokta *U. lobata* pada Luas Area Mata Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*)

Tabel 5.5 Luas area mata embrio *D. rerio* yang dipapar akut dekokta *U. lobata*

Perlakuan	n	X ± SD Luas area mata (pixel)
Kontrol	6	7734 ± 222 ^a
Dosis Terapi (500 mg/L)	6	7635 ± 196 ^a
Dosis ½ MATC (875 mg/L)	6	6717 ± 175 ^b
Dosis MATC (1750 mg/L)	6	5658 ± 340 ^c
Dosis LC ₅₀ (2500 mg/L)	6	3214 ± 406 ^d

Keterangan: a,b,c,d: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan efek yang signifikan ($p < 0.05$)



Gambar 5.5 Histogram rerata luas area mata embrio ikan zebra

Pemberian DUL dosis ½ MATC, MATC, dan LC₅₀ menurunkan luas area mata berturut-turut sekitar 10%, 30%, dan 60% dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Efek ini dikendalikan oleh senyawa alkaloid yang bekerja menghambat fase mitosis pada siklus pembelahan sel

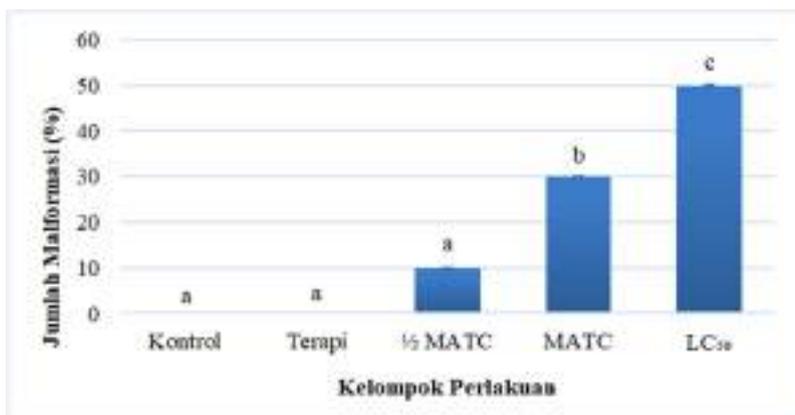
sehingga menimbulkan *microphthalmic*. Senyawa flavonoid yang mengalami autoksidasi menjadi radikal hidroksil berperan pula dalam kondisi ini. Senyawa radikal merusak komponen biokimia sel seperti protein, lipid, dan asam nukleat. Komponen protein yang mengatur siklus sel seperti *Cyclin-dependent kinases* (CDKs) mengalami gangguan akibat kerusakan oksidatif sehingga akan menurunkan proliferasi sel.

5.1.6 Efek Dekokta U. lobata pada Malformasi Somite Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*)

Tabel 5.6 Malformasi embrio *D. rerio* yang dipapar akut dekokta *U. lobata*

Perlakuan	n	X ± SD Jumlah malformasi (%)
Kontrol	3	0.00 ± 0.00 ^a
Dosis Terapi (500 mg/L)	3	0.00 ± 0.00 ^a
Dosis ½ MATC (875 mg/L)	3	10.00 ± 0.00 ^a
Dosis MATC (1750 mg/L)	3	30.00 ± 0.10 ^b
Dosis LC ₅₀ (2500 mg/L)	3	50.00 ± 0.10 ^c

Keterangan: a,b,c: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan efek yang signifikan ($p < 0.05$)



Gambar 5.6 Histogram rerata malformasi embrio ikan zebra

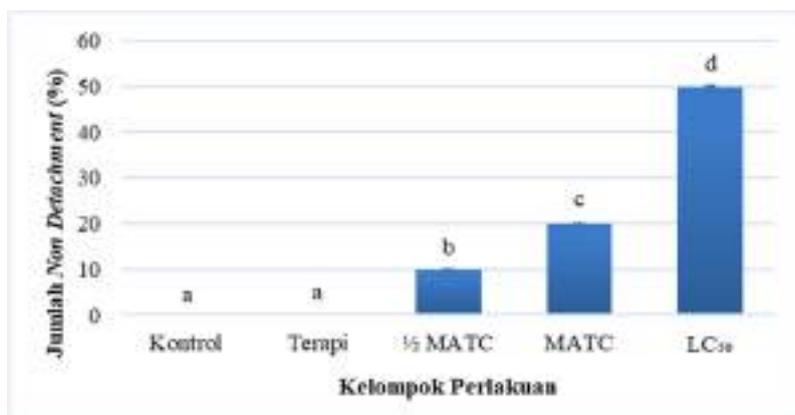
Pemberian DUL dosis MATC, dan LC₅₀ meningkatkan malformasi somite berturut-turut sekitar 30% dan 50% dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Efek ini dikendalikan oleh senyawa alkaloid yang bekerja menghambat fase mitosis pada siklus pembelahan sel sehingga menimbulkan gangguan pembentukan somite pada embrio. Senyawa flavonoid yang mengalami autoksidasi menjadi radikal hidroksil berperan pula dalam merusak komponen biokimia sel seperti protein, lipid, dan asam nukleat sehingga mengganggu pembentukan somite.

5.1.7 Efek Dekokta *U. lobata* pada Detachment Tail Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*)

Tabel 5.7 Detachment tail embrio *D. rerio* yang dipapar akut dekokta *U. lobata*

Perlakuan	n	X ± SD Jumlah non detachment (%)
Kontrol	3	0.00 ± 0.00 ^a
Dosis Terapi (500 mg/L)	3	0.00 ± 0.00 ^a
Dosis ½ MATC (875 mg/L)	3	10.00 ± 0.00 ^b
Dosis MATC (1750 mg/L)	3	20.00 ± 0.10 ^c
Dosis LC ₅₀ (2500 mg/L)	3	50.00 ± 0.10 ^d

Keterangan: a,b,c,d: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan efek yang signifikan ($p < 0.05$)



Gambar 5.7 Histogram rerata detachment tail embrio ikan zebra

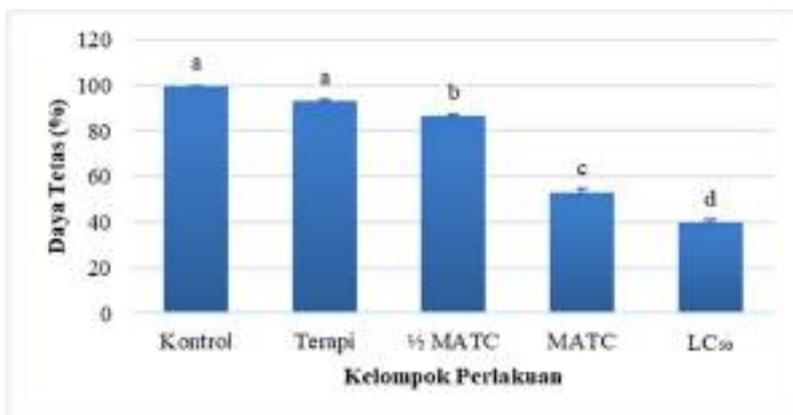
Pemberian DUL dosis MATC dan LC₅₀ meningkatkan malformasi *detachment tail* berturut-turut sekitar 10 %, 30%, dan 50% dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Efek ini dikendalikan oleh senyawa alkaloid yang bekerja menghambat fase mitosis pada siklus pembelahan sel sehingga menimbulkan gangguan pada proses *detachment tail*. *Non detachment tail* atau penundaan *detachment tail* ini merupakan gangguan proses pertumbuhan pada embrio.

5.1.8 Efek Dekokta U. lobata pada Daya Tetas Embrio Ikan Zebra (*D. rerio*)

Tabel 5.8 Daya tetas embrio *D. rerio* yang dipapar akut dekokta *U. lobata*

Perlakuan	n	X ± SD Daya tetas (%)
Kontrol	3	100.00 ± 0.00 ^a
Dosis Terapi (500 mg/L)	3	93.30 ± 0.58 ^a
Dosis ½ MATC (875 mg/L)	3	86.70 ± 0.58 ^a
Dosis MATC (1750 mg/L)	3	53.30 ± 1.52 ^b
Dosis LC ₅₀ (2500 mg/L)	3	40.00 ± 1.00 ^c

Keterangan: a,b,c: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan efek yang signifikan ($p < 0.05$)



Gambar 5.8 Histogram rerata daya tetas embrio ikan zebra

Pemberian DUL dosis MATC dan LC₅₀ menurunkan daya tetas embrio berturut-turut sekitar 50% dan 60% dibandingkan dengan

kontrol ($p < 0,05$). Efek ini dikendalikan oleh senyawa alkaloid yang bekerja menghambat fase mitosis pada siklus pembelahan sel sehingga menimbulkan gangguan daya tetas embrio berupa penundaan atau embrio tidak menetas.

5.2 Toksisitas Akut pada Fase Juvenile

5.2.1 Derajat Toksisitas Akut Dekokta *U. lobata* pada Juvenile Ikan Zebra (*D. rerio*)

Tabel 5.9 Nilai LC_{50} akut dekokta *U. lobata* fase juvenile ikan zebra (*D. rerio*)

No	Konsentrasi (mg/L)	Rerata Kematian (%)
1	500	0.00 ± 0.00
2	1000	4.10 ± 0.00
3	4000	10.00 ± 0.00
4	8000	30.00 ± 0.00
5	10000	70.00 ± 0.00
6	12000	83.33 ± 0.00
	Y = 0.0071x - 121.11 $LC_{50} = 8748.45$ mg/L	Toksisitas: Derajat ringan

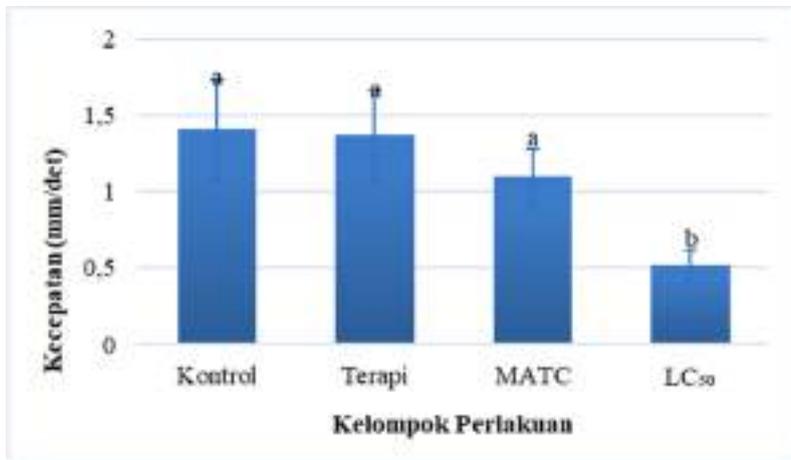
Toksisitas dekokta *U. lobata* pada fase juvenile masuk kategori ringan. Efek tersebut dipengaruhi oleh komposisi zat aktif *U. lobata* seperti alkaloid, saponin, dan tanin. Beberapa alkaloid bersifat sitotoksik yang bekerja menghambat mitosis pada siklus pembelahan sel sehingga menimbulkan kematian pada sel. Saponin bersifat mengganggu permeabilitas sel darah sehingga terjadi hemolisis yang berlanjut pada kondisi hipoksia. Tanin mengganggu enzim pembentuk sel dan proses pencernaan sehingga menimbulkan defisiensi nutrisi. Pada fase juvenile terjadi pertumbuhan yang pesat dan beberapa organ dan enzim belum berkembang sempurna sehingga lebih rentan terhadap senyawa xenobiotik dibandingkan fase dewasa. Interaksi antar senyawa aktif dapat memodulasi aktifitas biologis herba sehingga menurunkan efek toksisitasnya misalnya pada interaksi yang bersifat antagonistik.

5.2.2 Efek Dekok *U. lobata* pada Kecepatan Berenang Fase Juvenile Ikan Zebra (*D. rerio*)

Tabel 5.10 Kecepatan berenang fase juvenile *D. rerio* yang dipapar *U. lobata*

Perlakuan	n	X ± SD Kecepatan berenang (mm/det)
Kontrol	3	1.41 ± 0.33 ^a
Dosis Terapi (500 mg/L)	3	1.37 ± 0.29 ^a
Dosis MATC (6900 mg/L)	3	1.10 ± 0.18 ^a
Dosis LC ₅₀ (8900 mg/L)	3	0.52 ± 0.10 ^b

Keterangan: a,b: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan efek yang signifikan ($p < 0.05$)



Gambar 5.9 Histogram rerata kecepatan berenang fase juvenile ikan zebra

Pemberian DUL dosis LC₅₀ menurunkan kecepatan berenang sekitar 60% dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Efek ini dikendalikan oleh senyawa alkaloid yang bekerja di sistem saraf pusat sebagai agonis GABA (*Gamma Aminobutiric Acid*). Aktifasi GABA meningkatkan konduksi ion klorida sehingga terjadi hiperpolarisasi dan penurunan sekresi asetilkolin (Ach). Penurunan Ach akan menurunkan jumlah kanal yang terbuka sehingga terjadi depolarisasi dan penurunan aktifitas motorik.

5.3 Toksisitas Akut pada Fase Dewasa

5.3.1 Derajat Toksisitas Akut Dekokta *U. lobata* pada Ikan Zebra (*D. rerio*) Dewasa

Tabel 5.11 Nilai LC₅₀ akut *D. rerio* dewasa yang dipapar dekokta *U. lobata*

No	Konsentrasi (mg/L)	Rerata Kematian (%)
1	500	0.00 ± 0.00
2	2000	0.00 ± 0.00
3	6000	40.00 ± 0.00
4	8000	43.33 ± 0.00
5	12000	80.00 ± 0.00
	Y = 0.0072x - 8.234 LC ₅₀ = 8088.11mg/L	Toksisitas: Derajat ringan

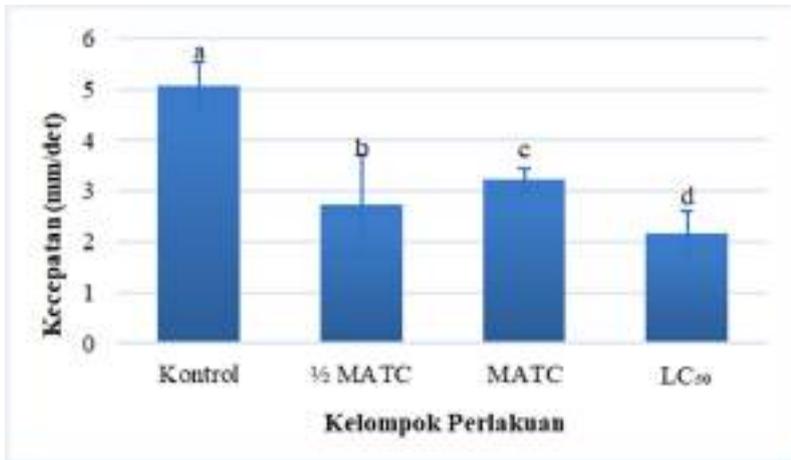
Toksisitas dekokta *U. lobata* pada fase dewasa masuk kategori ringan. Efek tersebut dipengaruhi oleh komposisi zat aktif *U. lobata* seperti alkaloid, saponin, dan tanin. Beberapa alkaloid bersifat sitotoksik yang bekerja menghambat mitosis pada siklus pembelahan sel sehingga menimbulkan kematian pada sel. Saponin bersifat mengganggu permeabilitas sel darah sehingga terjadi hemolisis yang berlanjut pada kondisi hipoksia. Tanin mengganggu enzim pembentuk sel dan proses pencernaan sehingga menimbulkan defisiensi nutrisi. Interaksi antar senyawa aktif dapat memodulasi aktifitas biologis herba sehingga menurunkan efek toksisitasnya misalnya pada interaksi yang bersifat antagonistik.

5.3.2 Efek Dekokta *U. lobata* pada Kecepatan Berenang Ikan Zebra (*D. rerio*) Dewasa

Tabel 5.12 Kecepatan berenang *D. rerio* dewasa yang dipapar dekokta *U. lobata*

Perlakuan	n	X ± SD Kecepatan berenang (mm/det)
Kontrol	3	5.06 ± 0.47 ^a
Dosis ½ MATC (1700 mg/L)	3	2.72 ± 0.99 ^b
Dosis MATC (3400 mg/L)	3	3.23 ± 0.22 ^c
Dosis LC ₅₀ (8000 mg/L)	3	2.16 ± 0.45 ^d

Keterangan: a,b,c,d: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan efek yang signifikan (p<0.05)



Gambar 5.10 Histogram rerata kecepatan berenang ikan zebra dewasa

Pemberian DUL dosis $\frac{1}{2}$ MATC, MATC, dan LC₅₀ menurunkan kecepatan berenang sekitar 50%, 40%, dan 60% dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Efek ini dikendalikan oleh senyawa alkaloid yang bekerja menghambat ikatan asetilkolin dengan reseptor nikotinik pada otot rangka sehingga menurunkan permeabilitas potensial membrane terhadap ion Na. Penurunan difusi Na menimbulkan potensial membrane tidak dinetralsisir oleh Na sehingga tidak terjadi depolarisasi. Inhibisi depolarisasi yang terus menerus menimbulkan penurunan aktifitas motorik bahkan paralisis.

Daftar Pustaka

1. Martin V, Roger VE. The Use of the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo for the Acute Toxicity Testing of Surfactants, as a Possible Alternative to the Acute Fish Test *AstraZeneca*, Brixham Environmental Laboratory, Brixham. UK. UK: 2SEAC, Unilever, Colworth, Sharnbrook, Bedford; 2010.
2. Stephanie P. Office of Research and Development National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Integrated Systems Toxicology Division. 2012.
3. Irawan I. Efek Pemaparan Copper Sulfat (CuSO₄) terhadap Daya Tetas Telur, Perubahan Histopatologik Insang Larva Ikan Zebra (*Brachydanio rerio*). *Journal of Tropical Fisheries*. 2011;6(2):588-592.
4. Scown TM, Santos EM, Johnston BD, Gasier BK. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicology Sciences*. 2010;115:521-534.

06-

Toksisitas Sub Kronik Urena Lobata pada Ikan Zebra (*Danio rerio*)

6.1 Toksisitas Sub Kronik Dekokta Daun *U. lobata* pada Fase Juvenile

Derajat toksisitas dekokta *U. lobata* berdasarkan nilai LC_{50} dapat dilihat pada **Tabel 6.1** dan **Tabel 6.2**.

Tabel 6.1 Persentase kematian juvenile ikan zebra yang dipapar *U. lobata* sub kronik

No	Konsentrasi (mg/L)	n	Rerata Kematian (%)
1	500	3	0.00 ± 0.00
2	1000	3	20.0 ± 0.00
3	4000	3	30.00 ± 0.00
4	8000	3	53.33 ± 0.57
5	10000	3	90.00 ± 1.00
	$Y = 0.0071x - 121.11$ $LC_{50} = 6123.43 \text{ mg/L}$		Toksisitas: Derajat ringan

Tabel 6.2 Analisa probit LC₅₀ *U. lobata* yang dipapar sub kronik pada juvenile

Waktu	Probabilitas	95% Confidence/Estimation
28 hari	0.1	1051.75
	0.2	2852.25
	0.3	4150.53
	0.4	5259.87
	0.5	6296.74
	0.6	8442.96
	0.7	9741.29
	0.8	11541.74
	LC₅₀ = 6296 mg/L	

Nilai LC₅₀ dekokta *U. lobata* yang dipapar sub kronik pada juvenile ikan zebra tidak jauh berbeda antara yang dihitung secara regresi dan probit, dengan derajat toksisitas kategori ringan.

6.2 Toksisitas Sub Kronik Dekokta Daun *U. lobata* pada Fase Dewasa

Derajat toksisitas dekokta *U. lobata* berdasarkan nilai LC₅₀ dapat dilihat pada **Tabel 6.3** dan **Tabel 6.4**.

Tabel 6.3 Persentase kematian ikan zebra dewasa yang dipapar *U. lobata* sub kronik

No	Konsentrasi (mg/L)	n	Rerata Kematian (%)
1	1000	3	0.00 ± 0.00
2	2000	3	3.33 ± 0.57
4	5000	3	43.33 ± 0.57
5	6000	3	66.60 ± 0.57
6	7500	3	96.66 ± 0.57
	Y = 0.0087x - 6.20 LC ₅₀ = 5321 mg/L		Toksisitas: Derajat ringan

Tabel 6.4 Analisa probit LC₅₀ *U. lobata* yang dipapar sub kronik pada ikan zebra

Waktu	Probabilitas	95% Confidence/Estimation
28 hari	0.1	4026.67
	0.2	4424.71
	0.3	4735.92
	0.4	5019.13
	0.5	5299.13
	0.6	5594.75
	0.7	5929.31
	0.8	6346.35
	LC₅₀ = 5299 mg/L	

Nilai LC₅₀ dekokta *U. lobata* yang dipapar sub kronik pada ikan zebra dewasa tidak jauh berbeda antara yang dihitung secara regresi dan probit, dengan derajat toksisitas kategori ringan.

6.3 Kecepatan Berenang Juvenile dan Ikan Zebra Dewasa yang Dipapar *U. lobata*

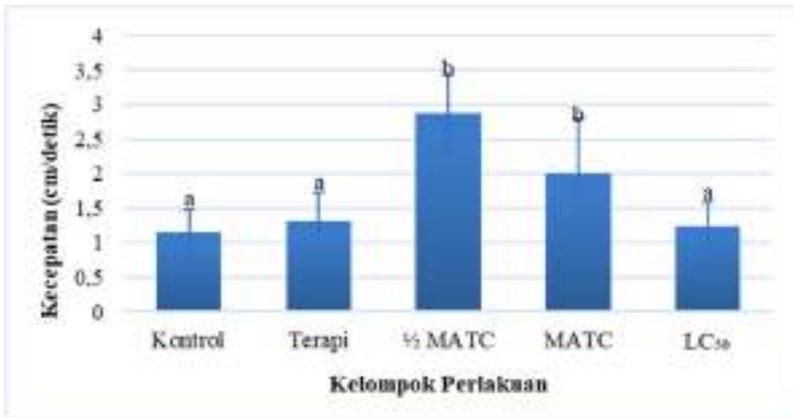
Efek toksik sub kronik dari *U. lobata* dievaluasi pada aktifitas motorik dengan mengamati kecepatan berenang ikan zebra pada fase juvenile dan dewasa.

6.3.1 Fase Juvenile dengan Pemaparan Sub Kronik

Tabel 6.5 Kecepatan berenang juvenile ikan zebra yang dipapar *U. lobata* sub kronik

No	Perlakuan	n	Kecepatan (cm/detik)
1	Kontrol	6	1.15 ± 0.33 ^a
2	Dosis Terapi (500)	6	1.31 ± 0.43 ^a
3	Dosis ½ MATC (1750)	6	2.88 ± 0.55 ^b
4	Dosis MATC (3500)	6	2.01 ± 0.80 ^b
5	Dosis LC ₅₀ (5300)	6	1.24 ± 0.35 ^a

Keterangan: a,b: notasi berbeda menunjukkan kecepatan berenang berbeda (p<0.05)



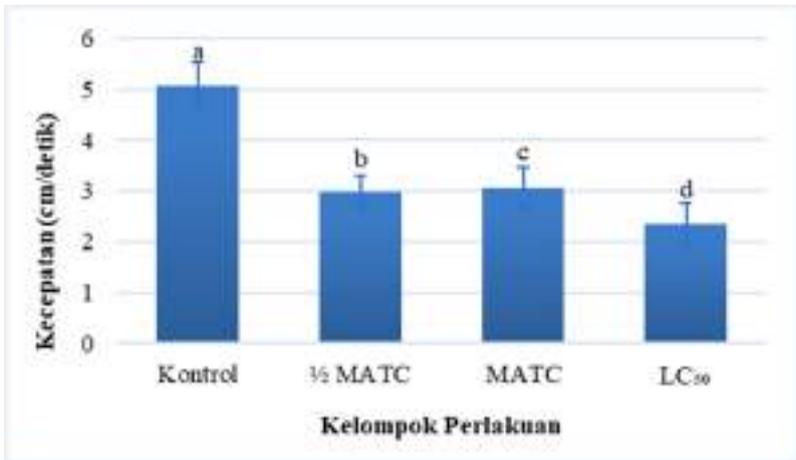
Gambar 6.1 Histogram rerata kecepatan berenang juvenile ikan zebra yang dipapar *U. lobata* sub kronik

6.3.2 Fase Dewasa dengan Pemaparan Sub Kronik

Tabel 6.6 Kecepatan berenang ikan zebra dewasa yang dipapar *U. lobata* sub kronik

No	Perlakuan	n	Kecepatan (cm/detik)
1	Kontrol	6	5.06 ± 0.47^a
2	Dosis 1/2 MATC (1750)	6	2.99 ± 0.31^b
3	Dosis MATC (3500)	6	3.05 ± 0.42^c
4	Dosis LC ₅₀ (5300)	6	2.35 ± 0.41^d

Keterangan: a,b,c,d: notasi berbeda menunjukkan kecepatan berenang berbeda ($p < 0.05$)



Gambar 6.2 Histogram rerata kecepatan berenang ikan zebra dewasa yang dipapar *U. lobata* sub kronik

Paparan sub kronik *U. lobata* menurunkan aktifitas motorik baik pada fase juvenile maupun pada fase dewasa. Pemberian *U. lobata* dosis LC₅₀ meningkatkan resiko toksisitas ditandai penurunan aktifitas motorik khususnya pada kelompok juvenile.

07-

Toksisitas Kronik Urena Lobata pada Ikan Zebra (*Danio rerio*)

7.1 Toksisitas Kronik Dekokta Daun *U. lobata*

Derajat toksisitas dekokta *U. lobata* berdasarkan nilai LC_{50} dapat dilihat pada Tabel 7.1 dan Tabel 7.2.

Tabel 7.1 Persentase kematian ikan zebra dewasa yang dipapar *U. lobata* kronik

No	Konsentrasi (mg/L)	n	Rerata Kematian (%)
1	500	3	0.00 ± 0.00
2	1000	3	0.00 ± 0.00
3	2000	3	10.00 ± 0.00
4	5000	3	60.00 ± 10.00
5	6000	3	90.00 ± 10.00
	$Y = 0.0164x - 15.455$ $LC_{50} = 3991.16 \text{ mg/L}$		Toksisitas: Derajat sedang

Tabel 7.2 Analisa probit LC_{50} *U. lobata* yang dipapar kronik pada ikan zebra

Waktu	Probabilitas	95% Confidence/Estimation
40 hari	.100	4974.32
	.200	4540.44
	.300	4251.257
	.400	4018.802

	.500	3813.038
	.600	3617.809
	.700	3419.990
	.800	3202.172
	LC₅₀ = 3813 mg/L	

Nilai LC₅₀ dekotta *U. lobata* yang dipapar sub kronik pada juvenile ikan zebra tidak jauh berbeda antara yang dihitung secara regresi dan probit, dengan derajat toksisitas kategori sedang.

Nilai LC₅₀ paparan kronik *Urena lobata* sebesar 3.991 mg/L termasuk derajat toksisitas sedang.¹ Efek toksik derajat sedang ini dikendalikan oleh komposisi zat aktif dalam daun *Urena lobata*.

Alkaloid pada herbal dilaporkan memiliki efek anti-mitosis dengan menghambat tubulin (protein penyusun mikrotubulus) sehingga terjadi penghancuran mikrotubulus dan gangguan enzim telomerase. Enzim telomerase yang terganggu menginduksi apoptosis dan kematian sel, sedangkan mikrotubulus yang hancur akan mengganggu proses metabolisme sel karena mikrotubulus berperan dalam pergerakan sel, pagositosis, transportasi makanan, dan hasil metabolisme sel.^{2,3} Selanjutnya saat terjadi gangguan metabolisme, maka fungsi organ akan menurun, dan bila terjadi pada jantung akan berakibat pada ketidakmampuan jantung untuk memompa darah yang teroksidasi. Saat suplai oksigen menurun akan terjadi kondisi hipoksia jaringan sehingga menimbulkan kematian.

Flavonoid berpotensi sebagai anti-oksidan dan anti-karsinogenik melalui penghambatan *carcinogen metabolizing enzymes* fase I dan II serta penghambatan pada protein kinase yang berperan pada sinyal transduksi proliferaif.⁴ Namun pada dosis yang tinggi flavonoid dapat menjadi mutagen, pro-oksidan yang menghasilkan radikal bebas dan penghambat enzim pemetabolisme hormon sehingga meningkatkan derajat toksisitasnya.⁵

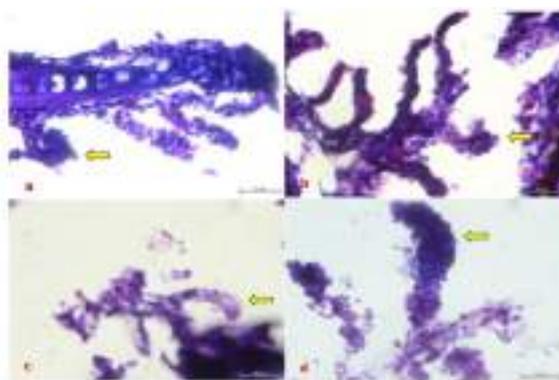
Saponin memiliki aktivitas sitotoksik dan hemolisis yang dapat digunakan sebagai agen anti-tumor.⁶ Efek sitotoksik dari saponin ini bisa berupa proses *apoptosis intrinsic pathway* seperti pada pelepasan *Cytochrome c*, depolimerasi mitokondria, dan aktivasi caspase 3 dan

9 atau berupa proses non-apoptosis seperti *autophagic cell death stimulation* dan penghambatan penghancuran sitoskeleton.⁷

Interaksi zat aktif dalam dekokta daun *Urena lobata* diduga meningkatkan derajat toksisitasnya. Saat senyawa kimia bekerja secara sinergis, maka efek terapi yang dihasilkan akan semakin besar, namun jika berlebihan dapat menjadi toksik. Efek sinergistik menimbulkan senyawa yang awalnya bersifat toksik menjadi semakin toksik saat berinteraksi dengan senyawa aktif lain.⁸ Hal ini berlaku pada saponin yang dikombinasi dengan senyawa anti-tumor lainnya akan meningkatkan aktivitas sitotoksiknya.⁷ Efek sinergistik ini dapat timbul saat suatu zat mengganggu biotransformasi zat lain sehingga menyebabkan zat lain menjadi lebih toksik.⁸

Lama paparan juga turut berperan dalam meningkatkan derajat toksisitas herbal. Pada uji toksisitas akut dan subkronik dekokta daun *Urena lobata* yang dilakukan Sherly⁹ dan Rohmatin¹⁰ menunjukkan derajat toksisitas ringan (*unpublished data*). Namun pada pemaparan kronik, dekokta daun *Urena lobata* menunjukkan peningkatan derajat toksisitasnya. Berdasarkan data di atas, dapat disimpulkan bahwa paparan kronik dekokta daun *Urena lobata* lebih kuat dibandingkan paparan subkronik dan akut.

7.2 Efek Paparan Kronik *U. lobata* Histopatologi Lamella Insang



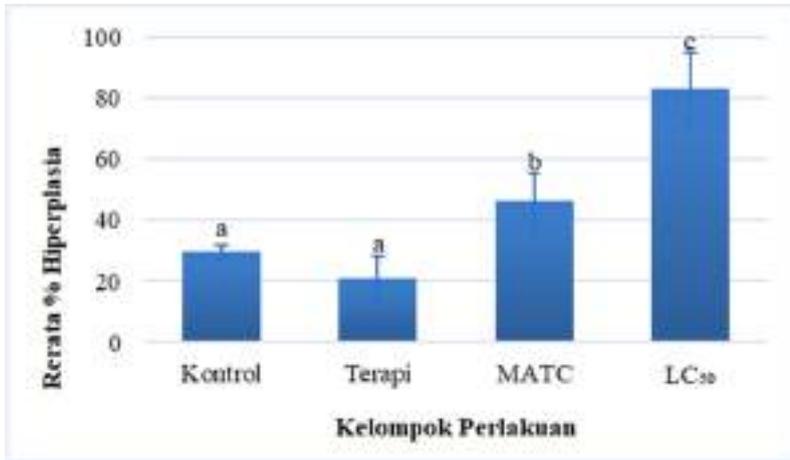
Gambar 7.1 Hiperplasia lamella insang ikan zebra yang dipapar *U. lobata* kronik. (A) Kontrol, (B) Dosis terapi, (C) Dosis MATC, (D) Dosis LC₅₀. Tanda panah kuning menunjukan hiperplasia sel.

Tabel 7.3 Persentase skor hiperplasia lamella insang ikan zebra yang dipapar *U. lobata* secara kronik

Perlakuan	Rerata ± SD	Skor	Keterangan
Kontrol	29,63 ± 2,27 ^a	1	Ringan
Dosis Terapi (1750)	21,17 ± 7,13 ^a	1	Ringan
Dosis MATC (3500)	46,53 ± 9,08 ^b	2	Sedang
Dosis LC ₅₀ (5300)	83,33 ± 11,79 ^c	3	Berat

Keterangan: a,b,c: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan efek yang signifikan ($p < 0.05$)

Paparan dosis MATC dan LC₅₀ kronik meningkatkan derajat hiperplasia lamella insang sedangkan pada dosis terapi tidak meningkatkan derajat hiperplasia lamella insang.



Gambar 7.2 Histogram rerata persentase hiperplasia lamella insang

Pemberian *Urena lobata* pada dosis terapi tidak signifikan menurunkan persentase hiperplasia lamella insang ($p \geq 0,05$), sedangkan pada dosis MATC dan LC₅₀ meningkatkan hiperplasia lamella insang secara signifikan berturut-turut sekitar $\frac{1}{2}$ kali lipat dan 2x lipat dibandingkan kontrol ($p \leq 0,05$). Persentase hiperplasia lamella insang antar kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p \leq 0,05$).

Pemberian dekokta daun *Urena lobata* pada dosis MATC dan dosis LC₅₀ meningkatkan persentase hiperplasia lamella insang secara signifikan dibanding kontrol. Efek tersebut dikendalikan oleh komposisi senyawa metabolit sekunder dalam dekokta daun *Urena lobata*.

Alkaloid dilaporkan meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan stress oksidatif.¹¹ Pembentukan ROS menyebabkan peroksidasi lipid dan menjadi salah satu penyebab terjadinya jejas sel.¹²

Flavonoid dapat menghambat respirasi mitokondria dan saponin memiliki efek sitotoksik melalui depolimerisasi membran mitokondria yang akan berakibat pada terganggunya proses pembentukan ATP dan terjadinya jejas sel.^{7,13} Pembentukan ATP pada sistem intraseluler cukup rentan terhadap efek dari jejas sel. Saat terjadi jejas sel, maka akan ada adaptasi dari sel untuk menyesuaikan dengan lingkungannya. Perubahan adaptif ini bisa berupa pertumbuhan sel atau diferensiasi sel, diantaranya atrofi, hipertrofi, metaplasia, dan hiperplasia.¹²

Adaptasi seluler pada lamella insang saat terjadi peningkatan mukus berupa hiperplasia. Peningkatan mukus merupakan respon adaptif untuk mengeluarkan zat toksik yang tersaring di lamella sekunder dan saat jumlah mukus terlalu berlebih akan menyebabkan kerja insang semakin berat sehingga akan terjadi adaptasi seluler.¹⁴ Menurut Scown *et al*¹⁵ dan Wang *et al*¹⁶ hiperplasia pada lamella insang akan meningkatkan jarak difusi untuk pertukaran oksigen sehingga terjadi insufisiensi oksigen di darah yang berakibat pada kondisi hipoksia. Hipoksia yang berlangsung lama akan menyebabkan kematian.

Peningkatan dosis dekokta daun *Urena lobata* pada penelitian meningkatkan hiperplasia lamella insang. Terjadi peningkatan hiperplasia lamella insang pada dosis MATC dan LC₅₀ lebih besar dibandingkan dosis terapi. Dekokta daun *Urena lobata* pada dosis MATC dan LC₅₀ meningkatkan hiperplasia lamella insang berturut-turut dalam kategori sedang dan berat. Hal ini sesuai dengan teori bahwa peningkatan dosis akan meningkatkan efek terapi atau efek toksik suatu zat.¹⁷

Pemberian dekokta daun *Urena lobata* dosis terapi menyebabkan penurunan hiperplasia lamella insang namun tidak signifikan dibanding

kontrol. Hal ini diduga karena dosis yang digunakan tergolong rendah sehingga tidak meningkatkan hiperplasia lamella insang.

Daftar Pustaka

1. Candra AA, Irwani N. Acute toxicity test of skin mangosteen (*garcinia mangostana* l.) and histopathologic study of liver. *Bangl. J. Vet. Med.* 2016;14(2):145-148.
2. Chabner BA, Bone. Phytochemical Gliceolin Isolated from Soy Mediated Antihormonal Effect Through Estrogen Receptor Alpha and Beta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2001;86:1750-1758.
3. Lantuejoul SJ, Soria JC, Moro-Sibilot D, Morat L, Veyrenc S, Lorimier P, *et al.* Differential Expression of Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) in Lung Tumor. *British Journal of Cancer.* 2004;90:1222-1229.
4. Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine.* 2004;37(3):287-303. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034.
5. Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine.* 2000;29(3-4):375-383. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00304-X.
6. Wang Y, Zhang Y, Zhu Z, Zhu S, Li Y, Li M, *et al.* Exploration of the correlation between the structure, haemolytic activity and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2007;15(7):2528-2532.
7. Podolak I, Galanty I, Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Review.* 2010;9(3):425-474.
8. Widyastuti, P. *Bahaya Bahan Kimia pada Kesehatan Manusia dan Lingkungan / WHO.* Jakarta: EGC. 2005.
9. Sherly FB. Toksisitas akut dekokta daun pulutan (*urena lobata*) pada ikan zebra (*danio rerio*) dewasa [studi pada nilai *lethal concentration-50* (LC50) dan kecepatan berenang]. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. 2017.
10. Rohmatin F. Toksisitas subkronik dekokta daun pulutan (*urena lobata* L.) pada ikan zebra (*danio rerio*) dewasa [studi terhadap nilai *lethal concentration-50* (LC-50) dan kecepatan berenang]. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. 2017.

11. Yamada T, Egashira N, Imuta M, Yano T, Yamauchi Y, Watanabe H, Oishi R. Role of oxidative stress in vinorelbine-induced vascular endothelial cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;48(1):120-127.
12. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Buku Ajar Patologi Robbins*, edisi 7. Jakarta: EGC. 2004.
13. Hodnick WF, Kung FS, Roettger WJ, Bohmont CW, Pardini RS. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: A structure-activity study. *Biochemical Pharmacology*. 1986;3(14):2345-2357. DOI: 10.1016/0006-2952(86)90461-2.
14. Irawan I. Efek Pemaparan Copper Sulfat (CuSO₄) terhadap Daya Tetas Telur, Perubahan Histopatologik Insang Larva Ikan Zebra (*Brachydanio rerio*). *Journal of Tropical Fisheries*. 2011;6(2):588-592.
15. Scown TM, Santos EM, Johnston BD, Gasier BK. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicology Sciences*. 2010;115:521-534.
16. Wang T, Long X, Liu Z, Cheng Y, Yan S. A Comparison effect of copper nanoparticles versus copper sulphate on Juvenile *Epinephelus coioides*: growth parameters, digestive enzymes, body composition, and histology as biomarkers. *International Journal of Genome*. 2015:1-10.
17. Wirasuta GAMI, Niruri R. *Buku Ajar Toksikologi Umum*. Bali: Universitas Udayana. 2007.

Tentang Penulis



Yudi Purnomo lahir di kota Malang pada tahun 1973 dan menyelesaikan pendidikan tingkat dasar hingga menengah di kota kelahirannya. Penulis menyelesaikan pendidikan tingkat sarjana (S.Si) dan profesi Apoteker di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya tahun 1998. Kemudian penulis menyelesaikan studi program Master bidang Biomedik (M.Kes) dan program Doktoral Ilmu Kedokteran (Dr) bidang Biomedik berturut-turut tahun 2006 dan 2015 di Universitas Brawijaya Malang. Selama menempuh pendidikan Doktoral, penulis mengikuti *Sandwich Like PhD Program* di Faculty of Medicine, Catholic Leuven University, Leuven, Belgia tahun 2012. Pada tahun 2019 penulis melanjutkan program *post-doctoral degree* di Faculty of Life Science, Ritsumeikan University, Kusatsu, Jepang. Penulis memiliki beberapa publikasi nasional dan internasional bereputasi di bidang Biomedik. Saat ini penulis aktif sebagai dosen dan peneliti di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang dan membimbing penelitian tingkat.

